

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-513827
(P2025-513827A)

(43)公表日 令和7年4月30日(2025.4.30)

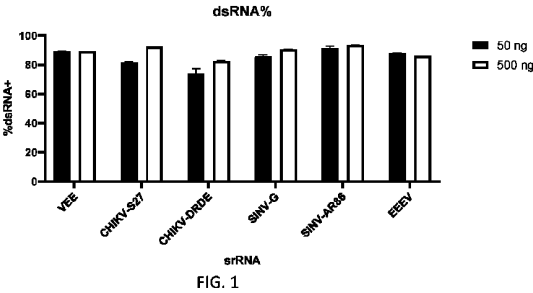
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/867 (2006.01)	C 1 2 N	15/867	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/47 (2006.01)	C 1 2 N	15/47	Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/10	2 2 0 Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		4 C 0 8 5
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全47頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-560232(P2024-560232)	(71)出願人	523031024	リプリケイト バイオサイエンス, イン コーポレイティド アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ソレント バレー ロード 1 1 5 5 8, スイート 6	
(86)(22)出願日	令和5年4月12日(2023.4.12)	(74)代理人	100099759		
(85)翻訳文提出日	令和6年11月27日(2024.11.27)	(74)代理人	弁理士 青木 篤		
(86)国際出願番号	PCT/US2023/065677	(74)代理人	100123582		
(87)国際公開番号	WO2023/201263	(74)代理人	弁理士 三橋 真二	最終頁に続く	
(87)国際公開日	令和5年10月19日(2023.10.19)	(74)代理人	100117019		
(31)優先権主張番号	17/720,002	(74)代理人	弁理士 渡辺 陽一		
(32)優先日	令和4年4月13日(2022.4.13)	(74)代理人	100141977		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	弁理士 中島 勝		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW), EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES, FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV 最終頁に続く	(74)代理人	100138210		

(54)【発明の名称】 狂犬病ウイルス感染症の予防及び治療のための組成物及び方法

(57)【要約】

本開示は、全体としては分子ウイルス学の分野に関し、特に、改変されたアルファウイルスのウイルスゲノム (alphavirus virus viral genome) 又は自己複製RNA (srRNA) 構築物をコードする核酸分子、それを含有する組換え細胞及び医薬組成物、並びに、細胞培養物中又は生体内で所望の産物を生成するためのそのような核酸分子、組換え細胞、及び組成物の使用に関する。また、免疫応答の誘導を必要とする対象において免疫応答を誘導するための方法、並びに、狂犬病ウイルス感染症を予防及び／又は治療するための方法が提供される。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

改変されたアルファウイルスのゲノム又は自己複製 RNA (srRNA) をコードする核酸配列を含む核酸構築物であって、前記の改変されたアルファウイルスのゲノム又は srRNA の、ウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列の少なくとも一部が、狂犬病ウイルスのエンベロープ糖タンパク質 G (RABV-G)、そのバリエーション、又はそれらの何れかの抗原決定基を含むポリペプチド構築物のコード配列と置き換えられている、核酸構築物。

【請求項 2】

前記抗原決定基が前記 RABV-G の N 末端側半分の中に存在する、請求項 1 に記載の核酸構築物。

10

【請求項 3】

前記抗原決定基が前記 RABV-G の C 末端側半分の中に存在する、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 4】

前記抗原決定基が、前記 RABV-G の抗原性部位 I、抗原性部位 II、抗原性部位 III、抗原性部位 IV、マイナー抗原性部位 A、又はこれらのうちの何れかの組み合わせを含む、請求項 1 に記載の核酸構築物。

【請求項 5】

前記エンベロープ糖タンパク質 G が病原性狂犬病ウイルス株又は非病原性狂犬病ウイルス株のエンベロープ糖タンパク質 G である、請求項 1～4 の何れか一項に記載の核酸構築物。

20

【請求項 6】

前記エンベロープ糖タンパク質 G が、Flury LEP 株、Flury LEP-C 株、Flury HEP 株、1088 株、AT6 株、CQ92 株、CVS-11 株、CVS-26 株、CVS-26 (G-N204S) 株、CYN1009D 株、CYN1026D 株、CYN1029D 株、CYN1138D 株、CYN1140D 株、CYN1141D 株、CYN1242H 株、CYN1243D 株、CYN1244D 株、CYN1245D 株、CYN1247D 株、CYN1249D 株、CYN1250D 株、CYN1251D 株、CYN1252D 株、CYN1253D 株、CYN1255D 株、CYN1256D 株、CYN1257D 株、CYN1259D 株、CYN1260D 株、CYN1261D 株、GX4 株、H-08-1320 株、H-1413-09 株、IP1586/10 株、IP2990/13 株、IP2991/13 株、IP2992/13 株、IP3176/09 株、IP4005/12 株、IP412/10 株、IP542/10 株、IP7941/09 株、J 株、JX-08-47 株、JX08-48 株、Kyoto 株、Kyoto (G-S204N) 株、N.HL 株、RC.HL 株、rHEP5.0-CVSG 株、RRV ON-99-2 株、SAD-B19 株、SH06 株、SHRBV-18 株、SNK-CTN 株、SRV9 株、Street Alabama Dufferin (HCP-SAD) 株、VRC-RZ2 株、ZJ-LA 株、及び ZJ-QZ 株から選択される狂犬病ウイルス株のエンベロープ糖タンパク質 G である、請求項 1～5 の何れか一項に記載の核酸構築物。

30

40

【請求項 7】

前記エンベロープ糖タンパク質 G が Flury LEP 株のエンベロープ糖タンパク質 G である、請求項 6 に記載の核酸構築物。

【請求項 8】

前記ポリペプチド構築物が前記 RABV-G、そのバリエーション、又はそれらの何れかの抗原決定基を安定化させる分子的变化を含む、請求項 1～7 の何れか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 9】

前記改変されたアルファウイルスのゲノム又は srRNA がウイルス構造タンパク質を

50

コードする核酸配列を含まない、請求項 1～8 の何れか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 10】

前記ポリペプチド構築物をコードする核酸配列がプロモーター配列に作動可能に連結されている、請求項 1～9 の何れか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 11】

前記プロモーター配列が 26S サブゲノム (sg) プロモーターである、請求項 10 に記載の核酸構築物。

【請求項 12】

前記改変されたアルファウイルスのゲノム又は srRNA が、VEEV/EEEV/WEVV 群、又は SFV 群、又は SINV 群に属するアルファウイルスのものである、請求項 1～11 の何れか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 13】

前記アルファウイルスがベネズエラウマ脳炎ウイルス (VEEV)、東部ウマ脳炎ウイルス (EEEV)、チクングニアウイルス (CHIKV)、西部ウマ脳炎ウイルス (WEVV)、又はシンドビスウイルス (SINV) である、請求項 12 に記載の核酸。

【請求項 14】

核酸配列が、配列番号 6～11 からなる群から選択される核酸配列に対して、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、少なくとも 99%、又は 100% の配列同一性を有する、請求項 1～13 の何れか一項に記載の核酸構築物。

【請求項 15】

請求項 1～14 の何れか一項に記載の核酸構築物を含む、組換え細胞。

【請求項 16】

前記組換え細胞が哺乳類細胞又は昆虫細胞である、請求項 15 に記載の組換え細胞。

【請求項 17】

薬剂的に許容できる賦形剤と、請求項 1～14 の何れか一項に記載の核酸構築物とを含む、医薬組成物。

【請求項 18】

前記組成物が送達媒体と共に送達系へと製剤化され、前記送達系が、リポソーム、ウイルスベリコン粒子 (VRP)、脂質ナノ粒子 (LNP)、ポリマーナノ粒子、生理的緩衝液、ミクロスフェア、免疫刺激複合体 (ISCOM)、生物活性リガンドのコンジュゲート、又はそれらのうちの何れかの組み合わせを含む、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記 LNP 送達系がカチオン性脂質、イオン化可能なカチオン性脂質、アニオン性脂質、又は中性脂質を含む、請求項 18 に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

前記脂質がおよそ 100:1～およそ 4:1 の脂質:RNA 質量比で存在する、請求項 18～19 の何れか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

前記脂質ナノ粒子が約 25nm～約 1000nm の平均直径を有する、請求項 18～20 の何れか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

前記組成物がワクチン又はアジュバントとして製剤化される、請求項 18～21 の何れか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記組成物が筋内投与用に製剤化される、請求項 17 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

免疫応答の誘導又は狂犬病感染症の治療を必要とする対象における免疫応答を誘導する、又は狂犬病感染症を治療する方法であって、請求項 1～14 の何れか一項に記載の核酸構築物を含む組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

免疫応答を誘導するための方法である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記免疫応答が中和抗体応答である、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記中和抗体応答が 0.5 IU/mL より大きい中和抗体価を含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記対象が狂犬病感染症を有している、又は狂犬病感染症を有していることが疑われる、請求項 24 に記載の方法。

10

【請求項 29】

前記組成物が、単剤予防若しくは単剤治療（単独療法）として個別に、又は、第 1 の治療法として少なくとも 1 つの追加の治療法と組み合わせて、前記対象に投与される、請求項 24 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022 年 4 月 13 日に出願された米国特許出願第 17 / 720, 002 号明細書に基づく優先権を主張するものであり、上記米国特許出願の開示は図面も含めてその全体が参照によって本明細書に援用される。

20

【0002】

配列表の参照による組み込み

添付の配列表中の資料は本出願への参照により本明細書に援用される。2023-04-06 Sequence Listing ST26 058462-510001WO.xml という名称の添付の配列表ファイルは、2023 年 4 月 6 日に作成されたものであり、サイズは 72,426 バイトである。

【0003】

技術分野

本開示は分子ウイルス学分野及び免疫学分野に関し、特に、改変されたアルファウイルスのウイルスゲノム又は自己複製 RNA (srRNA) をコードする核酸分子、組換え細胞、及びそれを含有する医薬組成物、並びに、細胞培養物中又は生体内で所望の産物を生成するためのそのような核酸分子、組換え細胞、及び組成物の使用に関する。また、免疫応答の誘導を必要とする対象において免疫応答を誘導するための方法、並びに、狂犬病ウイルス感染症を予防及び／又は治療するための方法が提供される。

30

【背景技術】

【0004】

狂犬病はウイルス性人獣共通感染症であり、100 を超える国や地域で風土病となっており、30 億を超える人々に脅威を与えている。この疾患は、暴露後予防がない場合に臨床症状が発症し、その後は例外なく致死となる (WHO epidemiological record 2010. No. 32 (85): 309-320. Rabies vaccine: WHO position paper)。WHO は毎年 55,000 例の狂犬病関連死が発生し、1000 万人超が暴露後処置 (PET) を受けていると推定している。

40

【0005】

現在利用できる狂犬病ワクチンとしては、最も広く使用されているが高リスクに曝されやすい神経組織ワクチンか、又は、より安全ではあるがコストが高い細胞培養ワクチン及び孵化鶏卵ワクチン (CCEEV) が挙げられる。神経組織ワクチンに付随するリスクとしては、固有のミエリン量に起因する自己免疫性中枢神経系疾患の誘導；複数回の注射の必要性；及び不確実な効力が挙げられる。WHO は神経組織ワクチンの使用を推奨して

50

おらず、貧困層への最新且つ高品質のワクチンの供給を増やすことを強く奨励している。トリ胚ワクチン及び細胞培養ワクチンは不活化された精製ウイルスを含有し、神経タンパク質を含まない。細胞培養生産法は神経組織ワクチンよりも安全で免疫原性が高いが、多くの時間と資源を必要とし、付随するコストが高いことから、現在のWHOによる推奨にもかかわらず、その使用は主に先進国に限定されている。

【0006】

細胞培養ワクチンによる暴露前予防（PrEP）は安全であり、リスクが高い個人（例えば、ラボスタッフ、獣医師、動物飼育係、野生動物研究者、及び狂犬病が風土病となっている地域への旅行者）に推奨されるが、コスト上の理由から主に先進国のみに限定されている。さらに、抗狂犬病ワクチンは狂犬病が風土病となっているアフリカ及びアジアの国々への旅行者に推奨されている。

10

【0007】

現在の問題は、これらのワクチンが不足していることであり、ある特定の時期には、暴露後予防にのみ利用でき、予防的ワクチン接種には利用できない。しかしながら、暴露後予防のための狂犬病ウイルスIgを利用できない場合がある発展途上国を訪問する旅行者には予防的ワクチン接種は重要である。

【0008】

以上から、どの時期にでも供給可能な、安全で効果的な狂犬病ワクチンが必要とされている。

【0009】

本明細書で提供される開示は、狂犬病ワクチンを作成するための以前の試みに存在した問題点への解決法を提供するものであり、狂犬病感染症の治療法及び予防法の改善をもたらす可能性がある。

20

【発明の概要】

【0010】

本開示は概して、狂犬病ウイルス感染症の予防及び管理で使用するための、組換え核酸構築物及びそれを含む医薬組成物などの、免疫療法薬の開発に関する。特に、以下でより詳細に説明するように、本開示のいくつかの実施形態は、改変されたアルファウイルスのゲノム又は自己複製RNA（srRNA）をコードする配列を含む核酸構築物であって、前記の改変されたアルファウイルスのゲノム又はsrRNAの、ウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列の少なくとも一部が、狂犬病ウイルスのエンベロープ糖タンパク質G（RABV-G）、そのバリエーション、又はそれらの何れかの抗原決定基を含むポリペプチド構築物のコード配列と置き換えられている、核酸構築物を提供する。また、本明細書で開示される核酸構築物のうちの1又は複数を含むように操作された組換え細胞、目的分子を生産するための方法、以下のうちの1又は複数を含む医薬組成物が開示される：（a）本開示の核酸構築物、（b）本開示の組換え細胞、又は（c）本開示の医薬組成物。さらに、本開示の特定の態様において、免疫応答の誘導を必要とする対象において免疫応答を誘導するための、並びに／又は、狂犬病ウイルス感染症の予防及び／若しくは治療のための、組成物及び方法が提供される。上記の概要は例示のみを目的としており、なんら限定的であることを意図していない。本明細書に記載の例示的な実施形態及び特徴に加えて、本開示のさらなる態様、実施形態、目的、及び特徴が、図面及び発明を実施するための形態及び特許請求の範囲から完全に明らかになるだろう。

30

40

【0011】

本開示の1つの態様において、改変されたアルファウイルスのゲノム又は自己複製RNA（srRNA）をコードする核酸配列を含む核酸構築物であって、前記の改変されたアルファウイルスのゲノム又はsrRNAの、ウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列の少なくとも一部が、狂犬病ウイルスのエンベロープ糖タンパク質G（RABV-G）、そのバリエーション、又はそれらの何れかの抗原決定基を含むポリペプチド構築物のコード配列と置き換えられている、核酸構築物が、本明細書において提供される。

【0012】

50

いくつかの実施形態において、抗原決定基は R A B V - G の N 末端側半分の中に存在する。

【0013】

いくつかの実施形態において、抗原決定基は R A B V - G の C 末端側半分の中に存在する。

【0014】

いくつかの実施形態において、抗原決定基は R A B V - G の抗原性部位 I、抗原性部位 I I、抗原性部位 I I I、抗原性部位 I V、マイナー抗原性部位 A、又はこれらのうちの何れかの組み合わせを含む。

【0015】

いくつかの実施形態において、エンベロープ糖タンパク質 G が病原性狂犬病ウイルス株又は非病原性狂犬病ウイルス株のエンベロープ糖タンパク質 G である。

【0016】

いくつかの実施形態において、エンベロープ糖タンパク質 G は F l u r y L E P 株、F l u r y L E P - C 株、F l u r y H E P 株、1088 株、A T 6 株、C Q 9 2 株、C V S - 11 株、C V S - 26 株、C V S - 26 (G - N 204 S) 株、C Y N 1009 D 株、C Y N 1026 D 株、C Y N 1029 D 株、C Y N 1138 D 株、C Y N 1140 D 株、C Y N 1141 D 株、C Y N 1242 H 株、C Y N 1243 D 株、C Y N 1244 D 株、C Y N 1245 D 株、C Y N 1247 D 株、C Y N 1249 D 株、C Y N 1250 D 株、C Y N 1251 D 株、C Y N 1252 D 株、C Y N 1253 D 株、C Y N 1255 D 株、C Y N 1256 D 株、C Y N 1257 D 株、C Y N 1259 D 株、C Y N 1260 D 株、C Y N 1261 D 株、G X 4 株、H - 08 - 1320 株、H - 1413 - 09 株、I P 1586 / 10 株、I P 2990 / 13 株、I P 2991 / 13 株、I P 2992 / 13 株、I P 3176 / 09 株、I P 4005 / 12 株、I P 412 / 10 株、I P 542 / 10 株、I P 7941 / 09 株、J 株、J X - 08 - 47 株、J X 08 - 48 株、K y o t o 株、K y o t o (G - S 204 N) 株、N . H L 株、R C . H L 株、r H E P 5 . 0 - C V S G 株、R R V O N - 99 - 2 株、S A D - B 19 株、S H 06 株、S H R B V - 18 株、S N K - C T N 株、S R V 9 株、S t r e e t A l a b a m a D u f f e r i n (H C P - S A D) 株、V R C - R Z 2 株、Z J - L A 株、及び Z J - Q Z 株から選択される狂犬病ウイルス株のエンベロープ糖タンパク質 G である。いくつかの実施形態において、エンベロープ糖タンパク質 G は F l u r y L E P 株のエンベロープ糖タンパク質 G である。

【0017】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド構築物は R A B V - G、そのバリエーション、又はそれらの何れかの抗原決定基を安定化させる分子的变化を含む。

【0018】

いくつかの実施形態において、改変されたアルファウイルスのゲノム又は s r R N A はウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列を含んでいない。

【0019】

いくつかの実施形態において、ポリペプチド構築物をコードする核酸配列はプロモーター配列に作動可能に連結されている。いくつかの実施形態において、プロモーター配列は 26 S サブゲノム (s g) プロモーターである。

【0020】

いくつかの実施形態において、改変されたアルファウイルスのゲノム又は s r R N A は V E E V / E E E V / W E E V 群、又は S F V 群、又は S I N V 群に属するアルファウイルスのものである。いくつかの実施形態において、アルファウイルスはベネズエラウマ脳炎ウイルス (V E E V)、東部ウマ脳炎ウイルス (E E E V)、チクングニアウイルス (C H I K V)、西部ウマ脳炎ウイルス (W E E V)、又はシンドビスウイルス (S I N V) である。

【0021】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、上記核酸配列は、配列番号 6 ~ 11 からなる群から選択される核酸配列に対して、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 %、又は 100 % の配列同一性を有する。

【0022】

1つの態様において、本明細書に開示されているような核酸構築物を含む組換え細胞が、本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、組換え細胞は哺乳類細胞又は昆虫細胞である。

【0023】

さらに別の態様において、薬剤的に許容できる賦形剤と本開示の核酸構築物とを含む医薬組成物が、本明細書で提供される。

【0024】

いくつかの実施形態において、上記組成物は送達媒体と共に送達系へと製剤化され、上記送達系は、リポソーム、ウイルスレプリコン粒子 (VRP)、脂質ナノ粒子 (LNP)、ポリマーナノ粒子、生理的緩衝液、ミクロスフェア、免疫刺激複合体 (ISCOM)、生物活性リガンドのコンジュゲート、又はそれらのうちの何れかの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、脂質はおよそ 100 : 1 ~ およそ 4 : 1 の脂質 : RNA 質量比で存在する。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は約 25 nm ~ 約 1000 nm の平均直径を有する。いくつかの実施形態において、上記組成物はワクチン又はアジュバントとして製剤化される。いくつかの実施形態において、上記組成物は筋内投与用に製剤化される。

【0025】

別の態様において、免疫応答の誘導又は狂犬病感染症の治療を必要とする対象において、免疫応答を誘導するための、又は狂犬病感染症を治療するための方法が、本明細書で提供される。上記方法は、本開示の核酸構築物を含む組成物を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態において、上記方法は免疫応答を誘導するための方法である。いくつかの実施形態において、免疫応答は中和抗体応答である。いくつかの実施形態において、中和抗体応答は 0.5 IU/mL 以上の中和抗体価を含む。いくつかの実施形態において、上記組成物は、単一の予防法又は治療法 (単独療法) として個々に、又は、第 1 の治療法として少なくとも 1 つの追加の治療法と組み合わせて、対象に投与される。

【図面の簡単な説明】

【0026】

本開示の特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に記述される。本開示の原理が利用される例示的な実施形態を記載する以下の発明を実施するための形態、及び添付図面を参照することにより、本開示の特徴及び利点のより深い理解が得られる。

【図 1】図 1 は、狂犬病ウイルス糖タンパク質 (RABV-G) をコードする種々の srRNA ベクターからの RNA 複製を示す棒グラフである。50 ng 又は 500 ng の srRNA がヌクレオフェクションによって 7.7E5 BHK-21 細胞にトランスフェクトされ、15 時間後、細胞が収集され、AF488 結合型抗 dsRNA 抗体で染色された。dsRNA 陽性細胞の頻度がフローサイトメトリー (FC) によって求められた。

【図 2】図 2 は、種々の srRNA ベクターからの狂犬病ウイルス糖タンパク質 (RABV-G) の相対発現を示す棒グラフである。50 ng 又は 500 ng の RABV-G 遺伝子をコードする srRNA がヌクレオフェクションによって 7.7E5 BHK-21 細胞にトランスフェクトされ、15 時間後、細胞が収集され、AF647 結合型抗 RabG 抗体 (1c5) で染色された。トランスフェクト細胞の平均蛍光強度 (MFI) がフローサイトメトリー (FC) によって求められた。

【図 3】図 3 は、srRNA ベースの狂犬病ワクチンがインビボで T 細胞応答を発生させることができることを示している (ELISpot)。srRNA-RABV-G (0.15 ug) を 1 回投与した 14 日後に IFN γ ELISpot によって測定された T 細胞応答が示されている。図 3 は、野生型 RABV-G に関する結果及び対応する統計値 (

10

20

30

40

50

$** < 0.01$) を示している。

【図 4】図 4 は、srRNA ベースの狂犬病ワクチンがインビボで防御的抗体応答を発生させることができることを示している。srRNA-RABV-G (0.15 ug) を 1 回投与した 14 日後に RFFIT 法 (Rapid Fluorescent Foci Inhibition Test) によって測定された中和抗体応答が示されている。防御的と見なされる 0.5 IU/ml の中和抗体価が、青色の線で示されている。統計値が示されている ($** < 0.01$; $* < 0.05$)。

【発明を実施するための形態】

【0027】

本開示は、全体として、狂犬病ウイルス感染症の予防的処置及び治療的処置の両方を目的とした、RABV-G のバリエーション又は抗原決定基を発現する核酸構築物に関する。これらの構築物は、免疫防御を誘導するために短期間の内に 3 回の投与を行うレジメンの必要性、及び、免疫応答の持久性が乏しいことによる定期的なブースターの必要性、に起因する現行の狂犬病ワクチンに関連する問題に取り組むものである。とりわけ、組換え細胞において狂犬病ウイルスのエンベロープ糖タンパク質 G (RABV-G)、そのバリエーション、又はそれらの何れかの抗原決定基を含むポリペプチド構築物のコード配列を発現するのに適した、優れた発現能を有する遺伝子発現系が、本明細書で提供される。例えば、本開示のいくつかの実施形態は、アルファウイルスの改変されたゲノム又は srRNA を含む、発現構築物及び発現ベクターなどの核酸構築物であって、前記の改変されたアルファウイルスのゲノム又は srRNA の、ウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列の少なくとも一部が、狂犬病ウイルスのエンベロープ糖タンパク質 G (RABV-G)、そのバリエーション、又はそれらの何れかの抗原決定基を含むポリペプチド構築物のコード配列と置き換えられている、核酸構築物に関する。さらに、本明細書で開示される核酸分子のうちの 1 又は複数を含むように遺伝子操作された組換え細胞が提供される。そのような組換え細胞から生じた生体材料及び組換え産物も、本出願の範囲内である。また、免疫応答の誘導又は狂犬病感染症の治療を必要とする対象において、免疫応答を誘導するのに、又は狂犬病感染症を治療するのに有用な、組成物及び方法が提供される。

【0028】

本明細書で使用される節の見出しは編成のみを目的としており、記載された主題を限定するものと解釈されるべきではない。

【0029】

本開示の種々の特徴が 1 つの実施形態の文脈で記載されていることがあるが、これらの特徴は、別個に提供されることもあれば、あるいは、任意の好適な組合せで提供されることもある。逆に、本開示は明確にするために別個の実施形態の文脈で本明細書に記載されていることがあるが、本開示は単一の実施形態で実施されることもある。

【0030】

定義

別段の定義がない限り、本明細書で使用される全ての述語、記号、及び他の科学用語又は専門用語は、本願が属する技術分野の当業者によって一般的に理解される意味を有することが意図される。場合により、一般に理解される意味を有する用語を、明確さのため、及び／又は、参照のし易さのために、本明細書において定義しているが、そのような定義を本明細書に包含することは、必ずしも、当該技術分野において一般に理解されることと大きな違いがあることを表していると解釈されるべきではない。本明細書において説明又は参照される手法及び手順の多くは、当業者によって、従来の方法論を用いて、十分に理解され、一般的に採用されるものである。

【0031】

単数形の「a」、「an」、及び「the」は、文脈上明らかにそうでない場合を除いて、複数形を包含する。例えば、「細胞」という用語は、1 つの細胞、又はその混合物を含む複数の細胞を包含する。「A 及び／又は B」とは、以下の選択肢の全てを含むように本明細書では使用される：「A」、「B」、「A 又は B」、並びに「A 及び B」。

【0032】

「投与」及び「投与すること」という用語は、本明細書で使用される場合、鼻腔内投与、経皮投与、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、リンパ節内投与、腹腔内投与、皮下投与、筋肉内投与、経口投与、腔内投与、及び局所投与、又はこれらの組み合わせを含むがこれらに限定はされない投与経路による、生物活性を有する組成物又は製剤の送達を指す。上記用語は、医療従事者による投与及び自己投与を包含するが、これらに限定はされない。

【0033】

「細胞」、「細胞培養物」、及び「細胞株」という用語は、特定の主題の細胞、細胞培養物、又は細胞株を指すだけでなく、培養における移植又は継代の回数に関係なく、そのような細胞、細胞培養物、又は細胞株の子孫又は潜在的子孫も指す。全ての子孫が親細胞と全く同一であるわけではないことは、理解されるべきである。これは、変異（例えば、故意又は不注意による変異）又は環境の影響（例えば、メチル化又は他のエピジェネティック修飾）により、後代には、ある特定の変化が生じる場合があるためであり、このため、子孫は、実際には、親細胞と同一でない可能性があるが、子孫が元の細胞、細胞培養物、又は細胞株のものと同一機能性を保持する限りは本明細書で使用されるこの用語の範囲内に包含される。

10

【0034】

「構築物」という用語は、異種の供給源からの1又は複数の核酸配列又はアミノ酸配列を含む、組換え分子、例えば、組換え核酸又は組換えポリペプチドを指す。例えば、ポリペプチド構築物は、起源が異なる2以上のアミノ酸配列が単一のポリペプチド構築物内で作動可能に互いに連結された、キメラポリペプチド分子とすることができる。同様に、核酸構築物は、由来が異なる2以上の核酸配列が集合して1つの核酸分子となった、キメラ核酸分子とすることができる。代表的な核酸構築物としては、1又は複数の核酸配列が作動可能に連結された核酸分子を含む、ゲノムインテグレーション又は自律増殖が可能な、プラスミド、コスミド、ウイルス、自己複製ポリヌクレオチド分子、ファージなどの、任意の供給源由来の、あらゆる組換え核酸分子、直鎖状又は環状の、一本鎖又は二本鎖のDNA又はRNA核酸分子を挙げることができる。2つ以上の核酸構築物が、1つのベクターなどの、1つの核酸分子内に含まれることがあり、あるいは、2つ以上の別々のベクターなどの、2つ以上の別々の核酸分子内に含まれることがある。

20

30

【0035】

本開示の組成物、例えば、核酸構築物、srRNA、組換え細胞、及び／又は医薬組成物の「有効量」、「治療有効量」、又は「薬剤的有效量」という語は、通常、当該組成物がない場合と比較して、当該組成物が記載された目的を達成する（例えば、投与される目的である効果を達成する、免疫応答を刺激する、疾患を予防若しくは治療する、又は、疾患、障害、感染症、若しくは健康状態の1若しくは複数の症状を低減する）ために十分な量を指す。「有効量」の一例は、疾患の1又は複数の症状の治療、予防、又は低減に寄与するのに十分な量であり、これは「治療有効量」と称されることもある。症状の「低減」とは、当該症状の重症度若しくは頻度の減少、又は、当該症状の消失を意味する。「治療有効量」を含む、組成物の正確な量は、治療の目的に依存し、公知の手法を用いて当業者によって確認可能である（例えば、Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); 及び Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkinsを参照されたい）。

40

【0036】

核酸が、脂質、重合体、及びタンパク質などの他の高分子を実質的に含んでいないこと

50

を言う場合に、本明細書で使用される、「ネイキッド」という用語。自己複製RNAなどの、「ネイキッド」な核酸は、細胞取り込みを向上させるために、他の高分子と一緒に配合されない。したがって、ネイキッド核酸は、リボソーム、微小粒子、ナノ粒子、カチオン性エマルジョンなどに封入されることも、それに対し吸収されることも、それに結合されることもない。

【0037】

「作動可能に連結された」という用語は、本明細書で使用される場合、2つ以上のエレメント間の、例えば、ポリペプチド配列間又はポリヌクレオチド配列間の、それらが意図された様式で動作することを可能にする、物理的又は機能的な連結を表す。例えば、「作動可能に連結された」という用語は、本明細書に記載の核酸分子又は核酸分子内のコード配列及びプロモーター配列の文脈で使用されている場合、上記コード配列及びプロモーター配列が、インフレームであり、且つ、空間的・距離的に適切に離れていることで、転写因子又はRNAポリメラーゼによる結合のそれぞれが転写に対して影響を与えることが可能であることを意味する。作動可能に連結されたエレメントは、隣接し合っている場合も、非隣接である（例えば、リンカーを介して互いに連結している）場合もあることは理解されよう。ポリペプチド構築物の文脈において、「作動可能に連結された」とは、アミノ酸配列間（例えば、異なるセグメント間、部分間、領域間、又はドメイン間）の物理的な連結（例えば、直接的又は間接的な連結）により、当該構築物の記載された活性がもたらされることを指す。本明細書で開示されるポリペプチド又は核酸分子の作動可能に連結されたセグメント、部分、領域、及びドメインは、隣接し合っている場合もあれば、非隣接である（例えば、リンカーを介して互いに連結している）場合もある。

【0038】

「一部」という用語は、本明細書で使用される場合、小部分を指す。ポリヌクレオチド配列又はアミノ酸配列又はタンパク質などの特定の構造に関して、その「一部」という用語は、当該構造の連続的又は非連続的な小部分を指す場合がある。例えば、アミノ酸配列の一部は、当該アミノ酸配列の、少なくとも1%、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、及び少なくとも90%のアミノ酸を含む。さらに、又はあるいは、この一部が非連続的な小部分である場合、この非連続的な小部分は、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、又はそれ以上の構造の一部（例えば、タンパク質のドメイン）から構成され、それぞれの一部はこの構造の連続的な要素である。例えば、アミノ酸配列の非連続的な小部分は、このアミノ酸配列の2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、又はそれ以上、例えば4個以下の一部から構成される場合があり、それぞれの一部は、このアミノ酸配列の、少なくとも1個、少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個の連続的なアミノ酸、少なくとも10個の連続的なアミノ酸、少なくとも20個の連続的なアミノ酸、又は少なくとも30個の連続的なアミノ酸を含む。

【0039】

値の範囲が記載されている場合、その範囲の上限値及び下限値の間にある、文脈によって特に明示されない限り下限値の単位の10分の1までの、間にある各値、並びに、その記載された範囲内の任意の他の記載された又は間にある値も、本開示に包含されることを理解されたい。記載範囲に具体的に除外される境界値がある場合は、これらのより小さな範囲の上限値及び下限値は、そのより小さな範囲内に互いに独立して含まれてもよく、これもまた本開示に包含される。記載範囲が境界の一方又は両方を含む場合、それらの含まれた境界の一方又は両方を除外した範囲も、本開示に包含される。

【0040】

本明細書では、「約」という用語に先行された数値によって、ある特定の範囲が示される。「約」という用語は、その用語が先行する正確な数字だけでなく、その用語が先行する数字に近い数字又は近似した数字を、文言上裏付けるために本明細書では使用される。ある数字が具体的に記載された数字に近いか近似しているかどうかを判断する際、近い

近似している記載されていない数字とは、その数字が提示された文脈において、具体的に記載された数字と実質的に同等である数字であり得る。近似の程度が文脈から明らかでない場合、「約」は、提供された値の±10%以内であること、又は提供された値を含む全ての場合において最も近い有効数字に丸められたことを意味する。いくつかの実施形態において、「約」という用語は、指定の値の、±10%まで、±5%まで、又は±1%まで、を示す。

【0041】

「パーセント同一性」という用語は、本明細書で2つ以上の核酸又はタンパク質と関連して使用される場合、2つ以上の配列又は部分配列が、下記の初期パラメーターを使用するBLAST若しくはBLAST2.0配列比較アルゴリズムを用いて測定された場合に、又は、手動のアラインメント及び目視検査によって測定された場合に、同一であること、又は、指定の割合の、同一であるヌクレオチド又はアミノ酸を有すること（比較ウィンドウ又は指定領域に渡って最大一致となるように比較及び整列された場合に、指定の領域に渡って、例えば、約60%の配列同一性、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又はそれ以上の配列同一性）を指す。例えば、ncbi.nlm.nih.gov/BLASTのNCBIウェブサイトを参照されたい。このような配列は「実質的に同一」とであると言われる。この定義は、配列の相補配列のことも指し、あるいはそれに適用され得る。この定義には、欠失及び／又は付加を有する配列、並びに置換を有する配列も含まれる。配列同一性は、公開された手法と、GCSプログラムパッケージ（Devereux et al., Nucleic Acids Res. 12:387, 1984）、BLASTP、BLASTN、FASTA（Atschul et al., J Mol Biol 215:403, 1990）などの広く利用可能なコンピュータプログラムを用いて、算出することができる。配列同一性は、その初期パラメーターを使用する、ウィスコンシン大学バイオテクノロジーセンター（1710 ユニバーシティ・アヴェニュー、マディソン、ウィスコンシン州 53705）のジェネティクス・コンピュータ・グループ（Genetics Computer Group）の配列解析ソフトウェアパッケージなどの配列解析ソフトウェアを用いて、測定することができる。

【0042】

「薬剂的に許容できる賦形剤」という用語は、本明細書で使用される場合、目的化合物を対象に投与するための、薬剂的に許容できる担体、添加剤、又は希釈剤を供する、あらゆる好適な物質を指す。したがって、「薬剂的に許容できる賦形剤」は、薬剂的に許容できる希釈剤と称される物質、薬剂的に許容できる添加剤と称される物質、及び薬剂的に許容できる担体と称される物質を包含することがある。本明細書で使用される場合、「薬剂的に許容できる担体」という用語は、医薬品投与に適合する、生理食塩水、溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張化剤及び吸収遅延剤などを包含するが、これらに限定はされない。補充的な活性化合物（例えば、抗生物質及び追加の治療薬）が、組成物に組み込まれることもある。

【0043】

本明細書で使用される場合、「対象」又は「個体」には、ヒト（例えば、ヒト個体）などの動物、及び非ヒト動物が含まれる。いくつかの実施形態において、「対象」又は「個体」は、医師の治療を受けている患者である。すなわち、対象は、目的の健康状態（例えば、狂犬病感染症）及び／又は上記健康状態の1若しくは複数の症状を有する、それを有するリスクがある、又はそれを有する疑いがある、ヒト患者又は個体であることがある。対象はまた、診断時以降に、目的の健康状態のリスクがあると診断された個体であることもある。「非ヒト動物」という用語には、全ての脊椎動物、例えば、哺乳類、例えば、げっ歯類、例えば、マウス、非ヒト霊長類、及び、他の哺乳類、例えば、ヒツジ、イヌ、雌ウシ、ニワトリなど、並びに、非哺乳類、例えば、両生類、爬虫類など、が含まれる。

【0044】

本明細書に記載されている本開示の態様及び実施形態は、態様及び実施形態「を含む」

、「からなる」、及び「から本質的になる」ことを包含すると理解される。本明細書で使用される場合、「を含む」は、「を包含する」、「を含有する」、又は「を特徴とする」と同義であり、包括的又はオープンエンドであり、追加の、未記載の要素又は方法工程を排除しない。本明細書で使用される場合、「からなる」は、クレームされた組成物又は方法において規定されていない、いかなる要素も、工程も、成分も排除する。本明細書で使用される場合、「から本質的になる」は、クレームされた組成物又は方法の基本的かつ新規な特徴に重大な影響を与えない材料又は工程を排除しない。本明細書において、特に組成物の成分の記載において、又は方法の工程の記載において、「含む」という用語のいかなる記載も、記載された成分又は工程から本質的になる、又はそれからなる、組成物及び方法を包含すると理解される。

10

【0045】

本明細書で開示される全ての遺伝子、遺伝子名、及び遺伝子産物は、本明細書で開示される組成物及び方法が適用可能な任意の種由来のホモログに相当することが意図される。すなわち、上記の用語は、ヒト由来及びマウス由来の遺伝子及び遺伝子産物を包含するが、これらに限定はされない。特定の種由来の遺伝子又は遺伝子産物が開示されている場合、本開示は、例示的であることのみが意図されており、それが現れた文脈が明示していない限り、限定と解釈されるべきではないことを理解されたい。すなわち、例えば、本明細書で開示される遺伝子又は遺伝子産物については、いくつかの実施形態では哺乳類の核酸配列及びアミノ酸配列に関するものであるが、他の哺乳類、魚類、両生類、爬虫類、及び鳥類を含むがこれらに限定はされない他の動物由来のホモログ及び／又はオルソログな遺伝子及び遺伝子産物を包含することが意図される。いくつかの実施形態において、遺伝子、核酸配列、アミノ酸配列、ペプチド、ポリペプチド、及びタンパク質は、ヒトのものである。「遺伝子」という用語は、そのバリエーションも包含することが意図される。

20

【0046】

明確さのために別々の実施形態と関連させて説明されている、本開示のある特定の特徴が、1つの実施形態において組み合わせて提供される場合もあることは理解されたい。逆に、簡潔さのために1つの実施形態に関連させて説明されている、本開示の種々の特徴が、別々に、又は任意の好適な部分組合せにおいて、提供される場合もある。本開示に係る実施形態の全ての組み合わせは、本開示に具体的に包含され、各々全ての組み合わせが個別にかつ明示的に開示されているかのように、本明細書で開示される。加えて、様々な実施形態及びその要素の全ての部分組合せもまた、本開示に具体的に包含され、そのような部分組合せの各々全てが本明細書で個別にかつ明示的に開示されているかのように、本明細書で開示される。

30

【0047】

アルファウイルス

アルファウイルスは、一本鎖のプラス鎖RNAゲノムを有する、小型のエンベロープRNAウイルスである。アルファウイルス属としては、特に、シンドビスウイルス (*Sindbis virus*) (*SINV*)、セムリキ森林ウイルス (*Semliki Forest virus*) (*SFV*)、ロスリバーウイルス (*Ross River virus*) (*RRV*)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス (*Venezuelan equine encephalitis virus*) (*VEEV*)、東部ウマ脳炎ウイルス (*EEEV*)、及び西部ウマ脳炎ウイルス (*WEEV*) が挙げられ、これらは全て近縁種であり、哺乳類、げっ歯類、魚類、鳥類、並びにヒト及びウマなどのより大型の哺乳類といった様々な脊椎動物、並びに、昆虫などの無脊椎動物に感染することができる。特に、シンドビスウイルス及びセムリキ森林ウイルスは広く研究されており、これらのウイルスの生活環、複製様式などはよく特徴付けがなされている。

40

【0048】

アルファウイルスのゲノムは、およそ12Kb長であり、以下の2つのオープンリーディングフレーム (ORF) からなる：非構造タンパク質 (nsP) をコードする7Kbのフレーム及び構造ポリタンパク質をコードする4Kbのフレーム。非構造ポリタンパク質

50

(n s P) は切断されることで、宿主細胞の細胞質内でのウイルスmRNAの転写及び翻訳に必要な4つの異なるタンパク質 (n s P 1、n s P 2、n s P 3、及びn s P 4) になる。

【0049】

n s P 1タンパク質は、新たに合成されたウイルスのゲノムRNA及びサブゲノムRNAのメチル化及びキャッピングを指示する、グアニン-7-メチルトランスフェラーゼ (MTase) 活性及びグアニリルトランスフェラーゼ (GTase) 活性の両方を有するmRNAキャッピング酵素である。n s P 1のN末端ドメイン内のMTaseモチーフは、S-アデノシルメチオニン (AdoMet) からGTP分子のN7位 (m7Gppp) へのメチル基の移行を触媒する。次いで、GTaseがそのm7Gpppと結合することで、触媒ヒスチジンと共有結合を形成し (m7Gp-GTase)、PPiを放出する。次いで、GTaseはm7Gp分子を5'-ニリン酸RNAに移すことで、m7GpppNp-RNAを生成する。得られたキャップ構造は、ウイルスmRNAの翻訳に必須であり、このmRNAが細胞の5'エキソヌクレアーゼによって分解されることを防ぐ。このN末端ドメインに続くのは、n s P 1タンパク質が細胞膜に結合することを可能にする特徴である。αヘリックス両親媒性ループ部位及びパルミトイル化部位が存在することで、おそらくはn s P 1と膜の陰イオン性リン脂質との相互作用を介して、n s P 1タンパク質及びn s P 1含有複製複合体が原形質膜上に係留することが可能となる。

10

【0050】

n s P 2タンパク質は多数の酵素活性と機能的役割を有する。N末端領域は、スーパーファミリー1 (SF1) ヘリカーゼの7つのシグネチャーモチーフを有するヘリカーゼドメインを含有する。このヘリカーゼドメインは、ウイルスRNAのキャッピング反応の最初を担う、RNAトリホスファターゼとして機能する。このヘリカーゼドメインはまた、ヌクレオチドトリホスファターゼ (NTPase) としても機能し、RNAヘリカーゼ活性の燃料となる。n s P 2のC末端領域は、パパイン様システインプロテアーゼを含み、ウイルス非構造ポリタンパク質のプロセッシングに関与している。上記プロテアーゼは、上記ポリタンパク質内の保存されたモチーフを認識する。このタンパク質分解機能は高度に制御されており、n s P 2の他のドメインによって調節される。このアルファウイルスn s P 2タンパク質は、感染宿主細胞における転写及び翻訳の遮断、並びに、ウイルス性因子による翻訳機構の制御に寄与するインターフェロン (IFN) 介在性抗ウイルス反応の阻害に関与する病原性因子としても記述されている。

20

30

【0051】

複製複合体におけるアルファウイルスn s P 3タンパク質の明確な役割は、これよりも明らかになっていない。n s P 3タンパク質には3つのドメインが認識されている：ホスファターゼ活性と核酸結合能を有するN末端の大ドメイン、アルファウイルスユニークドメイン (AUD)、及びC末端の超可変ドメイン。SFV n s P 3のこのドメインの欠失はウイルス病原性の低下をもたらすことが分かっており、ウイルスRNA転写制御におけるその重要性が示唆されている。

【0052】

n s P 4ポリメラーゼは、アルファウイルスにおいて最も高度に保存されたタンパク質であり、最も分岐したものでも、他のアルファウイルスn s P 4と比較した場合にアミノ酸配列が50%超同一である。n s P 4は、コアとなるRNA依存性RNAポリメラーゼ (RdRp) ドメインをC末端に含んでおり、これが単独で、ウイルス複製複合体のRNA合成特性を担っていることが判明している。このRdRpは、マイナス鎖RNAを介したゲノムRNAの複製及び26SサブゲノムRNAの転写に関与している。N末端ドメインはアルファウイルス特有であり、部分的に構造が乱れていることがある。

40

【0053】

アルファウイルスのゲノムの5'側の3分の2は、ウイルスRNAの転写及び複製に必要ないくつかの非構造タンパク質 (n s P) をコードしている。これらのタンパク質がRNAから直接翻訳されると、細胞タンパク質と一緒にあって、ウイルスゲノム複製及びs

50

gRNAの転写に必須のRNA依存性RNAポリメラーゼを形成する。4つのnsP (nsP1、nsP2、nsP3、nsP4)は、1つのポリタンパク質として生成され、ウイルスの複製機構を構成する。このポリタンパク質のプロセッシングは高度に制御された様式で起こり、P2/P3接合部位の切断が、ゲノム複製中のRNA鋳型の使用に影響を及ぼす。この部位は、狭い切れ目の底部に位置しており、容易にアクセスできない。一旦切断されると、nsP3は、nsP2を取り囲む環構造を生成する。これらの2つのタンパク質は広大な境界面を有する。非細胞変性ウイルス又は温度感受性表現型を生み出すnsP2における変異は、P2/P3境界領域に密集している。nsP2非細胞変性変異の位置の反対側のP3変異は、P2/P3の効率的な切断を妨げる。これはひいては、RNA感染性に影響を及ぼし、ウイルスRNA生成レベルを変えることがある。

10

【0054】

上記ゲノムの3'側の3分の1は、ウイルス粒子を形成するために必要とされる全ての構造タンパク質(コアとなるヌクレオカプシドタンパク質C、並びにヘテロ二量体として会合するエンベロープタンパク質のP62及びE1)の翻訳を行うための鋳型として働くsgRNAを含む。これらのウイルス膜アンカー型表面糖タンパク質は、受容体認識及び膜融合を介した標的細胞内への侵入に関与する。このsgRNAは、nsP4タンパク質をコードするRNA配列の3'末端に存在するp26Sサブゲノムプロモーターから転写される。タンパク質分解によりP62がE2及びE3へと成熟することで、ウイルス表面に変化が生じる。E1とE2、そして時にE3とが一緒になって、糖タンパク質「スパイク」はE1/E2二量体又はE1/E2/E3三量体を形成しており、E2は中心から各頂点に伸び、E1は頂点間の空間を充填し、E3は、存在する場合、スパイクの遠位端に位置する。ウイルスがエンドソームの酸性度に曝されると、E1がE2から解離してE1ホモ三量体を形成し、これが、細胞膜とウイルス膜と一緒にする融合段階に必要となる。アルファウイルス糖タンパク質E1はクラスIEウイルス融合タンパク質であり、インフルエンザウイルス及びHIVに存在するクラスI融合タンパク質とは構造が異なっている。E2糖タンパク質は、その細胞質ドメインを介してヌクレオカプシドと相互作用する機能を果たし、一方、その外部ドメインは細胞受容体との結合に関与する。大部分のアルファウイルスは周辺タンパク質であるE3を失っているが、セムリキウイルスでは、E3はウイルス表面と結合して残っている。

20

【0055】

アルファウイルス複製は宿主細胞内の膜表面上で起こることが報告されている。感染サイクルの第1のステップで、ゲノムRNAの5'末端が、RNAポリメラーゼ活性を有するポリタンパク質(nsP1~4)へと翻訳され、これがゲノムRNAに相補的なマイナス鎖を生成する。ゲノムRNAの3'末端の配列は、マイナス鎖合成開始で重要な役割を果たし、複製が起こるためには最低限の数のアデニル酸残基が必須であることが特定されている。特に、既に報告されているように、アルファウイルスのゲノムが複製するためには、3'UTRに続くポリA鎖が少なくとも11残基でなければならない、これがあることで効率的にマイナス鎖合成が開始され、その結果複製が起こる。また、既に報告されているように、ポリA鎖を25残基に伸ばすと、結果として複製が増強されるが、ポリAをさらに34残基にまで伸ばすと複製のさらなる増強は認められなかった。加えて、ポリA内部のA以外の残基は複製に有害である場合がほとんどであり、このことは、酵素的なポリA鎖伸長が、3'UTRの後に3'アデニル酸残基を含むだけではないsrRNAには利きしないことを示唆している。既に報告されているように、ポリA鎖のアデニル酸残基が25個を超えるRNA鋳型ではマイナス鎖合成の増強は見られない。複製の第2のステップで、このマイナス鎖が2つのRNAの生産を行うための鋳型として使用され、この2つのRNAとはそれぞれ、(1)翻訳によって他のnsPを生産し、このウイルスのゲノムとして働く、二次ウイルスのゲノムに相当する、プラス鎖(positive)ゲノムRNA;及び、(2)感染性粒子を形成するウイルスの構造タンパク質をコードするsgRNAである。プラス鎖ゲノムRNA/sgRNAの比は、ポリタンパク質がタンパク質分解による自己切断でnsP1、nsP2、nsP3、及びnsP4になることで制御される

30

40

50

。実際には、ウイルスの遺伝子発現は２段階で起こる。第１段階では、プラス鎖ゲノムとマイナス鎖の主要な合成がある。第２段階では、s g R N Aの合成が実質的に独占で行われ、そのため大量の構造タンパク質の生産が起こる。

【 0 0 5 6 】

自己複製 R N A

当業者には理解されるように、「自己複製 R N A」という用語は、許容細胞内でそれ自体の自己増幅又は自己複製を指示するために必要とされる遺伝情報の全てを含む R N A分子を指す。それ自体の複製を指示するために、s r R N Aは通常、１）ポリメラーゼ、レプリカーゼ、又は、ウイルス性若しくは宿主細胞由来のタンパク質、核酸若しくはリボ核タンパク質と相互作用することで、R N A増幅プロセスを触媒し得る他のタンパク質をコードし；且つ、２）サブゲノム R N A（s g R N A）の複製及び転写に必要とされるシス作動性 R N A配列を含有する。これらの配列は、複製プロセス中に、その自己にコードされたタンパク質、又は非自己にコードされた細胞由来のタンパク質、核酸、若しくはリボ核タンパク質、又はこれらの成分の何れか同士の複合体に、結合される場合がある。本開示のいくつかの実施形態において、アルファウイルス s r R N A構築物は、通常、以下の要素を含む：複製にシスで必要な 5' ウイルス R N A配列又は不完全干渉 R N A配列、生物学的に活性なアルファウイルス非構造タンパク質（例えば、n s P 1、n s P 2、n s P 3、及び n s P 4）をコードする配列、s g R N A用のサブゲノムプロモーター（s g）、複製のためにシスで必要とされる 3' ウイルス配列、並びに、所望により、ポリアデニル酸鎖（p o l y a d e n y l a t e t r a c t）（ポリ A）。場合により、異種配列の発現を指示するサブゲノムプロモーター（s g）が、本開示の s r R N A構築物に含められることがある。

【 0 0 5 7 】

さらに、s r R N Aという用語は、通常、プラス極性、又は「メッセージ」センスの分子を指し、s r R N Aは、いかなる既知の天然アルファウイルスの長さとも異なる長さを有する場合がある。本開示のいくつかの実施形態において、s r R N Aは、アルファウイルス構造タンパク質のうちの１若しくは複数の、コード配列の少なくとも一部を含まず；且つ／又は、構造遺伝子をコードする配列が異種配列と置換されることがある。s r R N Aが組換えアルファウイルス粒子にパッケージングされることとなる場合、s r R N Aは、粒子形成をもたらすアルファウイルス構造タンパク質との相互作用を開始する働きをする１又は複数の配列、いわゆるパッケージングシグナル、を含むことがある。

【 0 0 5 8 】

本開示の s r R N A構築物は、通常、少なくとも約 2 k bの長さを有する。例えば、s r R N Aは、少なくとも約 2 k b、少なくとも約 3 k b、少なくとも約 4 k b、少なくとも約 5 k b、少なくとも約 6 k b、少なくとも約 7 k b、少なくとも約 8 k b、少なくとも約 9 k b、少なくとも約 10 k b、少なくとも約 11 k b、少なくとも約 12 k bの、又は 12 k bよりも長い、長さを有することがある。いくつかの実施形態において、s r R N Aは、約 4 k b～約 20 k b、約 4 k b～約 18 k b、約 5 k b～約 16 k b、約 6 k b～約 14 k b、約 7 k b～約 12 k b、約 8 k b～約 16 k b、約 9 k b～約 14 k b、約 10 k b～約 18 k b、約 11 k b～約 16 k b、約 5 k b～約 18 k b、約 6 k b～約 20 k b、約 5 k b～約 10 k b、約 5 k b～約 8 k b、約 5 k b～約 7 k b、約 5 k b～約 6 k b、約 6 k b～約 12 k b、約 6 k b～約 11 k b、約 6 k b～約 10 k b、約 6 k b～約 9 k b、約 6 k b～約 8 k b、約 6 k b～約 7 k b、約 7 k b～約 11 k b、約 7 k b～約 10 k b、約 7 k b～約 9 k b、約 7 k b～約 8 k b、約 8 k b～約 11 k b、約 8 k b～約 10 k b、約 8 k b～約 9 k b、約 9 k b～約 11 k b、約 9 k b～約 10 k b、又は約 10 k b～約 11 k bの長さを有することがある。いくつかの実施形態において、s r R N Aは、約 6 k b～約 14 k bの長さを有することがある。いくつかの実施形態において、s r R N Aは、約 6 k b～約 16 k bの長さを有することがある。

【 0 0 5 9 】

狂犬病ウイルスエンベロープ糖タンパク質 G (RABV-G)

狂犬病ウイルスは長さ約180nm、直径75nmの弾丸型である。そのゲノムは非分節型のマイナス鎖一本鎖RNAである。このゲノムは5つの構造タンパク質、3'N-P-M-G-L5'をコードしている；N（核タンパク質）、P（リン酸化タンパク質）、M（マトリックスタンパク質）、G（糖タンパク質）、及びL（RNA依存性RNAポリメラーゼ）。このゲノムの3'末端及び5'末端のリーダー非翻訳領域及びトレーラー非翻訳領域がこれらの構造遺伝子を挟んでおり、これらのタンパク質コード領域の間には、ノンコーディング遺伝子間配列がある；N-P、P-M、M-G、G-L。

【0060】

これら5つの構造タンパク質のうち、Gはエンベロープ上に存在し、外側に露出される唯一のタンパク質である。糖タンパク質は、糖ユニットと共有結合しているタンパク質である。狂犬病ウイルス糖タンパク質(RABV-G)は、三量体I型膜貫通タンパク質であって、1回貫通型であり、細胞膜に対して、細胞外にN末端を、細胞質内にC末端を持つ。RABV-G前駆体は524アミノ酸(aa)長（モコラウイルスでは522aa）であり、そのN末端には19aaのシグナルペプチドが含まれる。その成熟タンパク質は、N末端外部ドメイン(439aa)、膜貫通セグメント(22aa)、及び細胞質側末端／内部ドメイン／ENDO(44aa)を有する。このGタンパク質は、ビリオンエンベロープの外表面を覆っているため、唯一の標的抗原となって、ウイルス中和抗体を誘導することができる。

【0061】

本開示の組成物

以下でより詳細に説明するように、本開示の1つの態様は、改変されたアルファウイルスのゲノム又はsrRNAをコードする配列を含む核酸構築物であって、前記の改変されたアルファウイルスのゲノム又はsrRNAの、ウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列の少なくとも一部が、狂犬病ウイルスのエンベロープ糖タンパク質G(RABV-G)、そのバリエーション、又はそれらの何れかの抗原決定基を含むポリペプチド構築物のコード配列と置き換えられている、核酸構築物に関する。また、本明細書に開示されているような核酸構築物を含むように操作された組換え細胞及び細胞培養物が提供される。

【0062】

核酸構築物

以下でより詳細に説明するように、本開示の1つの態様は、アルファウイルスの改変されたゲノム又はsrRNAをコードする核酸配列を含む核酸構築物であって、前記の改変されたアルファウイルスのゲノム又はsrRNAの、ウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列の少なくとも一部が、狂犬病ウイルスのエンベロープ糖タンパク質G(RABV-G)、そのバリエーション、又はそれらの何れかの抗原決定基を含むポリペプチド構築物のコード配列と置き換えられている、核酸構築物に関する。いくつかの実施形態において、核酸構築物をコードする配列は、作動可能に連結されている、例えば、宿主細胞、対象、又はエキソビボの無細胞発現系でのsrRNA構築物の発現を可能にする、発現に必要なとされるエレメント（例えば、プロモーター配列）の制御下に置かれることがある。

【0063】

「核酸分子」及び「ポリヌクレオチド」という用語は、本明細書では同義的に使用されており、RNA分子とDNA分子の両方を指し、cDNAを含む核酸分子、ゲノムDNAを含む核酸分子、合成DNAを含む核酸分子、及び、核酸アナログを含むDNA分子又はRNA分子を包含する。核酸分子は二本鎖であることも一本鎖（例えば、センス鎖又はアンチセンス鎖）であることもある。核酸分子は非従来の、又は改変されたヌクレオチドを含んでいてもよい。「ポリヌクレオチド配列」及び「核酸配列」という用語は、本明細書で使用される場合、同義的に、ポリヌクレオチド分子の配列を指す。37 CFR § 1.822に記載されているようなヌクレオチド塩基の命名法が本明細書では使用される。

【0064】

本開示の核酸分子は、任意の長さとすることができ、例えば、約 1.5 Kb～約 50 Kb、約 5 Kb～約 40 Kb、約 5 Kb～約 30 Kb、約 5 Kb～約 20 Kb、又は約 10 Kb～約 50 Kb、例えば、約 15 Kb～30 Kb、約 20 Kb～約 50 Kb、約 20 Kb～約 40 Kb、約 5 Kb～約 25 Kb、又は約 30 Kb～約 50 Kb が挙げられる。

【0065】

本開示の方法の非限定的且つ好ましい実施形態は、以下の特徴のうちの 1 又は複数を含むことがある。いくつかの実施形態において、アルファウイルス srRNA ベクターは、アルファウイルス srRNA ベクターのウイルス構造タンパク質、CP、E1、E2、E3、及び 6K のうちの 1 又は複数をコードする核酸配列の少なくとも一部を含まない。いくつかの実施形態において、アルファウイルス srRNA ベクターは、CP をコードする配列の一部又は全体を含まない。いくつかの実施形態において、アルファウイルス srRNA ベクターは、E1 をコードする配列の一部又は全体を含まない。いくつかの実施形態において、アルファウイルス srRNA ベクターは、E2 をコードする配列の一部又は全体を含まない。いくつかの実施形態において、アルファウイルス srRNA ベクターは、E3 をコードする配列の一部又は全体を含まない。いくつかの実施形態において、アルファウイルス srRNA ベクターは、6K をコードする配列の一部又は全体を含まない。いくつかの実施形態において、アルファウイルス srRNA ベクターは、CP、E1、E2、E3、及び 6K の組み合わせをコードする配列の一部又は全体を含まない。本開示のいくつかの実施形態においては、アルファウイルス srRNA ベクターの非構造タンパク質である nsP1、nsP2、nsP3、及び nsP4 のコード配列は存在するが、アルファウイルス srRNA ベクターの 1 又は複数の構造タンパク質（例えば、CP、E1、E2、E3、及び 6K）をコードする配列の少なくとも一部又は全体が存在しない。

【0066】

いくつかの実施形態において、アルファウイルス srRNA ベクターは、1 又は複数のウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列のかなりの部分を含んでいない。ウイルス構造ポリペプチドをコードする核酸配列のかなりの部分は、当業者による当該配列の手動評価により、又は、BLAST（例えば、“Basic Local Alignment Search Tool”；Altschul SF et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1993 を参照されたい）などのアルゴリズムを用いた、コンピューターで自動化された配列比較及び同定により、当該ポリペプチドの推定上の同定を得るために十分な、ウイルス構造ポリペプチドをコードする核酸配列を含み得ると、当業者には理解される。したがって、ヌクレオチド配列のかなりの部分は、当該配列を含む核酸断片の特異的な同定及び／又は単離を得るのに十分な配列を含む。例えば、核酸配列のかなりの部分は、完全長の核酸配列の少なくとも約 20%、例えば、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、約 95% を含み得る。

【0067】

いくつかの実施形態において、アルファウイルス srRNA ベクターはウイルス構造タンパク質をコードする配列全体を含まず、例えば、アルファウイルス srRNA ベクターはウイルス構造タンパク質をコードする核酸配列を含まない。

【0068】

いくつかの実施形態において、アルファウイルス srRNA ベクターは、CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCCTGGACCT（配列番号 2）を含む配列を含む。いくつかの実施形態において、アルファウイルスベクターは、GACCGCTACGCCCCCAATGACCCGACCAAGC（配列番号 3）を含む配列を含む。いくつかの実施形態において、アルファウイルス srRNA ベクターは、CTGGAGACGTGGAGGAGAACCCCTGGACCT（配列番号 2）を含む配列と、GACCGCTACGCCCCCAATGACCCGACCAAGC（配列番号 3）を含む配列と、を含む。

【0069】

本開示の核酸構築物は、改変されたアルファウイルスのゲノム又は srRNA の、ウイ

ルス構造タンパク質をコードする核酸配列の少なくとも一部を置き換えた、ポリペプチド構築物のコード配列をさらに含む。原則として、本明細書で開示される核酸構築物は通常、いかなる数の、ポリペプチド構築物のコード配列も含むことができる。いくつかの実施形態において、本明細書で開示される核酸構築物は、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、又は少なくとも6つの、ポリペプチド構築物のコード配列を含むことがある。ポリペプチド構築物のコード配列は、コード配列と、インビボ及び／又はエキソビボにおいて細胞内で当該コード配列を適切に転写及び／又は翻訳することを指示するのに十分な制御情報と、を含有する遺伝物質の構築物とすることができる。ポリペプチド構築物のコード配列は、所望の宿主細胞を標的化するためにベクターに、及び／又は対象に、挿入されることがある。したがって、いくつかの実施形態において、「ポリペプチド構築物のコード配列」という用語は、「発現構築物」という用語と同義的に用いられることがある。いくつかの実施形態において、ポリペプチド構築物のコード配列は、例えばプロモーター及び／又は終結シグナルなどの調節エレメントに作動可能に連結したタンパク質又は機能性RNAをコードする遺伝子と、所望により、当該遺伝子の転写又は翻訳に影響を及ぼす他の核酸配列の何れか又はその組み合わせと、を含む核酸構築物であり得る。

10

【0070】

本明細書に記載の核酸構築物は、免疫応答を引き起こすことができるエピトープを含有するポリペプチドをコードする、狂犬病ウイルスのエンベロープ糖タンパク質G（RABV-G）、そのバリエーション、又はそれらの何れかの抗原決定基のコード配列を含む。RABV-Gのバリエーションは、少なくとも1つのアミノ酸が改変されている、例えば、それぞれ、欠失している、挿入されている、又は置換されていることを除いて、参照タンパク質（例えば、RABV-G）のものと同じ又は本質的に同じアミノ酸配列を有するポリペプチドのコード配列を包含し得る。アミノ酸置換は、好ましくは当該タンパク質の非必須アミノ酸残基における、保存的アミノ酸置換である場合がある。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似側鎖を有するアミノ酸残基と置換されるものである。類似側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当該技術分野において公知である。これらのファミリーとしては、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。タンパク質のバリエーションは、当該タンパク質のアミノ酸配列に対して、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、又は少なくとも約99%、好ましくは少なくとも約90%、より好ましくは少なくとも約95%の同一性を有するアミノ酸配列を有する場合がある。好ましくは、バリエーションは、タンパク質の機能的バリエーションであって、当該タンパク質と同じ機能を保持するものである。「バリエーション」という用語は、核酸配列を指して使用されている場合、別の、通常は関連する核酸（nucleotide acid）配列と、1又は複数のヌクレオチドだけ異なる核酸配列を指す。したがって、「バリエーション」という用語は、1又は複数の新規ヌクレオチドの挿入、1又は複数のヌクレオチドの欠失、及び1又は複数の既存ヌクレオチドの置換を包含する、参照核酸の1又は複数のヌクレオチドの変化を指すことがある。バリエーションは、点変異、複数の変異、一塩基多型（SNP）、欠失、挿入、及び転座を含むこともある。すなわち、本明細書に記載のコード配列のバリエーションは、RABV-Gの、例えば、完全長の、変異型の、切断型の、不活性化型の、ペプチド／エピトープ又はその組み合わせであり得るポリペプチドをコードする核酸を含む。

20

30

40

【0071】

本明細書に記載の核酸構築物は、狂犬病ウイルスのエンベロープ糖タンパク質G（RABV-G）

50

B V - G)、又はその抗原決定基のコード配列を含むこともある。いくつかの実施形態において、抗原決定基は、狂犬病ウイルス糖タンパク質GのN末端側半分の中に存在する。他の特定の抗原決定基は、狂犬病ウイルスのC末端側半分の中に存在する。このような抗原決定基は、狂犬病ウイルス糖タンパク質Gの、例えば、第1番～第50番、第50番～第100番、第100番～第150番、第150番～第200番、第200番～第250番、第250番～第300番、第300番～第350番、第350番～第400番、第400番～第450番、第450番～第500番、第500番～第524番のアミノ酸内、又はその任意の合間、一部、若しくは範囲の中に存在し得る。1つの実施形態において、抗原決定基は、狂犬病ウイルス糖タンパク質GのN末端側半分の中、すなわち、およそ第19番から第422番のアミノ酸残基の間に存在する。別の実施形態において、抗原決定基は、狂犬病ウイルス糖タンパク質GのC末端側半分の中、すなわち、およそ第1番から第19番のアミノ酸残基の間に存在する。別の実施形態において、狂犬病糖タンパク質Gの抗原決定基は、第336番～第442番のアミノ酸残基を含む。1つの実施形態において、狂犬病糖タンパク質Gは、第336番のアミノ酸残基、及び置換又は欠失などのその変化を含む。

10

【0072】

いくつかの実施形態において、狂犬病糖タンパク質Gの抗原決定基は1又は複数のエピトープを含む。エピトープの非限定例としては、直鎖状エピトープ、高次構造的エピトープ、不連続エピトープ、又はそのようなエピトープの組み合わせが挙げられる。「エピトープ」という用語が、パラトープとして知られる、抗原結合性ポリペプチドの特定の抗原結合部位、例えば抗体分子の可変領域、と相互作用する抗原決定基を指すことは、当業者には理解される。単一の抗原が2つ以上のエピトープを有することがある。すなわち、異なる抗体が、抗原上の異なる領域に結合する場合があります、異なる生物学的効果を及ぼす場合があります。「エピトープ」という用語は、B細胞が反応する抗原上の部位のことも指す。この用語は、抗体が結合する抗原の領域のことも指す。エピトープは、構造的エピトープ又は機能的エピトープと定義することができる。機能的エピトープは、通常は一連の構造的エピトープであり、相互作用の親和性に直接寄与する残基を有する。エピトープは、直鎖状であることもあれば、高次構造的、すなわち、非直鎖状アミノ酸から構成されていることもある。ある実施形態において、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、又はスルホニル基などの、化学的活性を有する表面分子の集まりである決定基を含むことがあり、ある実施形態においては、特定の三次元的構造特性、及び／又は特定の電荷特性を有することがある。

20

30

【0073】

別の関連実施形態において、狂犬病糖タンパク質Gの抗原決定基は、抗原性部位I、抗原性部位II、抗原性部位III、抗原性部位IV、マイナー抗原性部位A、又はそのような抗原性部位の組み合わせ、例えば抗原性部位IIIとマイナー抗原性部位Aを含むか、それからなる。狂犬病ウイルスの抗原性部位は、モノクローナル抗体パネルと、それらのそれぞれのモノクローナル抗体耐性ウイルス変異体とを用いて特定された。狂犬病ウイルス中和モノクローナル抗体の大部分が、抗原性部位IIを対象にしており (Benmansour et al., "Antigenicity of Rabies Virus Glycoprotein," J. Virol. 65: 4198-4203 (1991)、参照によって本明細書に援用される)、第34番～第42番aa及び第198番～第200番aaを含む不連続な高次構造的エピトープである (Prosniak, et al. 2003. Development of a cocktail of recombinant-expressed human rabies virus-neutralizing monoclonal antibodies for postexposure prophylaxis of rabies. J. Infect. Dis. 188: 53-56)。抗原性部位IIIは、第330番～第338番aaにおける連続的な高次構造的エピトープであり、ウイルスの病原性に影響を及ぼす2つの荷電残基K330及びR333を有する (Coulon et al.

40

50

1998. An avirulent mutant of rabies virus is unable to infect motoneurons in vivo and in vitro. J. Virol. 72:273-278; Dietzschold et al. 1983. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:70-74; Seif et al. 1985. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. J. Virol. 53:926-934)。
高次構造的な抗原性部位Ⅰは、たった1つのモノクローナル抗体509-6によって定義されたものであり、第231番aaに位置する(Benmansour et al., "Antigenicity of Rabies Virus Glycoprotein," J. Virol. 65:4198-4203 (1991); Lafon et al. 1983. Antigenic sites on the CVS rabies virus glycoprotein: analysis with monoclonal antibodies. J. Gen. Virol. 64:843-8451)。抗原性部位Ⅳは、重なり合った直鎖状エピトープを有することが知られている(Bunschoten et al., 1989. Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein. J. Gen. Virol. 70:291-298; Luo et al. 1997. A virus-neutralizing epitope on the glycoprotein of rabies virus that contains Trp251 is a linear epitope. Virus Res. 51:35-41; Ni et al. 1995. Mapping and characterization of a sequential epitope on the rabies virus glycoprotein which is recognized by a neutralizing monoclonal antibody, RG719. Microbiol. Immunol. 39:693-702)。Benmansour et al. では、342位~343位に位置するマイナー部位の存在のことも記載されており、近接しているが抗原性部位Ⅲとは異なるものである。

10

20

30

40

50

【0074】

本明細書に記載の核酸構築物のRABV-Gは、病原性狂犬病ウイルス株又は非病原性狂犬病ウイルス株由来であり得る。

【0075】

現在使用されている抗狂犬病ワクチンは、不活化ウイルスから作製されたワクチン、又は病原性が減弱したウイルス株若しくは組換えウイルスからなるワクチンである。

【0076】

ウイルスは、様々な方法によって、特にホルムアルデヒドや3-プロピオラクトンによる処理などの化学的手法によって、不活化することができる。

【0077】

ウイルス株の病原性の減弱化は周知であり；例えば、減弱化は、ウイルス株を異なる宿主で、ベクタータイプ（例えば、ウサギ又はマウス）で、又は細胞培養物中で、連続継代することで実行され得る。すなわち、菌株は、宿主源に対して適応度が低いために、その宿主に対して病原性が低い、ワクチン接種能は維持している。

【0078】

非病原性狂犬病株 (rabies strain) は、エンベロップ糖タンパク質 G に 1 又は複数の変異を含んでいる場合が多い (例えば、Flamand et al., “Avirulent Mutants of Rabies Virus and Their Use as Live Vaccine,” Trends Microbiol. 1 (8): 317-20 (1993); Coulon et al., “An Avirulent Mutant of Rabies Virus is Unable to Infect Motorneurons In Vivo and In Vitro,” J. Virol. 72 (1): 273-278 (1998) 参照)。例として、攻撃用ウイルス標準 (challenge virus standard) 菌株 (CVS)、CVS 誘導体、又はストリート・アラバマ・ダファリン (Street-Alabama-Dufferin) (SAD) ベルン (Bern) 菌株の何れから単離されたものであり、G における 333 位のアルギニン (Arg) がグルタミン (Gln)、グリシン (Gly)、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、システイン、又はセリンの何れかに置き換えられている、RABV-G の抗原性変異体は、非病原性である (Tuffereau et al., Arginine or lysine in position 333 of ERA and CVS glycoprotein is necessary for rabies virulence in adult mice. Virology. 1989; 172: 206-212; Seif et al., Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting an antigenic site III of the glycoprotein. J Virol. 1985; 53: 926-934)。加えて、G における 333 位の Arg がグルタミン酸に置き換えられた組換えウイルスも非病原性である (McGettigan et al., Second-generation rabies virus-based vaccine vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 gag have greatly reduced pathogenicity but are highly immunogenic. J Virol. 2003; 77: 237-244)。すなわち、概して、RABV は、G における 333 位の Arg 又は Lys を他のアミノ酸に変化させると非病原性になる。

【0079】

原則として、エンベロップ糖タンパク質 G を誘導することができる狂犬病ウイルス株は特に限定されない。本明細書で開示される組成物及び方法に好適な狂犬病ウイルス株の非限定例としては、Flury LEP 株、Flury LEP-C 株、Flury HEP 株、1088 株、AT6 株、CQ92 株、CVS-11 株、CVS-26 株、CVS-26 (G-N204S) 株、CYN1009D 株、CYN1026D 株、CYN1029D 株、CYN1138D 株、CYN1140D 株、CYN1141D 株、CYN1242H 株、CYN1243D 株、CYN1244D 株、CYN1245D 株、CYN1247D 株、CYN1249D 株、CYN1250D 株、CYN1251D 株、CYN1252D 株、CYN1253D 株、CYN1255D 株、CYN1256D 株、CYN1257D 株、CYN1259D 株、CYN1260D 株、CYN1261D 株、GX4 株、H-08-1320 株、H-1413-09 株、IP1586/10 株、IP2990/13 株、IP2991/13 株、IP2992/13 株、IP3176/09 株、IP4005/12 株、IP412/10 株、IP542/10 株、IP7941/09 株、J 株、JX-08-47 株、JX08-48 株、Kyoto 株、Kyoto (G-S204N) 株、N.HL 株、RC.HL 株、rHEP5.0-CVSG 株、RRV ON-99-2 株、SAD-B19 株、SH06 株、SHRBV-18 株、SNK-CTN 株、SRV9 株、Street Alabama Dufferin (HCP-SAD) 株、VRC-

R Z 2 株、Z J - L A 株、及び Z J - Q Z 株が挙げられる。いくつかの実施形態において、エンベロープ糖タンパク質 G は F l u r y L E P 株のエンベロープ糖タンパク質 G である。

【 0 0 8 0 】

非限定的な R A B V - G タンパク質の完全長アミノ酸配列は配列番号 1 に記載され、以下の通りである：

M V P Q V L L F V P L L G F S L C F G K F P I Y T I P D K L G P W S P I D I H H
L S C P N N L V V E D E G C T N L S E F S Y M E L K V G Y I S A I K V N G F T C
T G V V T E A E T Y T N F V G Y V T T T F K R K H F R P T P D A C R A A Y N W K
M A G D P R Y E E S L H N P Y P D Y H W L R T V K T T K E S L V I I S P S V T D
L D P Y D K S L H S R V F P G G N C S G I T V S S T Y C S T N H D Y T I W M P E
N L R L G T S C D I F T N S R G K R A S K G G K T C G F V D E R G L Y K S L K G
A C K L K L C G V L G L R L M D G T W V A M Q T S D E T K W C P P G Q L V N L H
D F R S D E I E H L V V E E L V K K R E E C L D A L E S I M T T K S V S F R R L
S H L R K L V P G F G K A Y T I F N K T L M E A D A H Y K S V R T W N E I I P S
K G C L R V G G R C H P H V N G V F F N G I I L G S D G H V L I P E M Q S S L L
Q Q H M E L L E S S V I P L M H P L A D P S T V F K D G D E V E D F V E V H L P
D V H E Q V S G V E L G L P N W G K Y V L M I A G A L I A L M L I I F L M T C C
R R V N R P E S T Q S S L G E T G R N V S V T S Q S G K V I S S W E S Y K S G G
E T R L

10

20

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の核酸構築物中の R A B V - G のコード配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列をコードしている。いくつかの実施形態において、本開示の核酸構築物は、配列番号 1 のアミノ酸配列に対して、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する、R A B V - G をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、本開示の核酸構築物は、配列番号 1 中のアミノ酸残基のうち 1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、又は 5 つが異なるアミノ酸残基に置き換えられている、配列番号 1 のアミノ酸配列を有する R A B V - G をコードする核酸配列を含む。いくつかの実施形態において、R A B V - G のコード配列は、配列番号 1 のアミノ酸配列のより小さな部分をコードしている。例えば、これらのより小さな部分は、配列番号 1 の少なくとも 8 個、少なくとも 1 0 個、少なくとも 1 2 個、少なくとも 1 4 個、少なくとも 1 6 個、少なくとも 1 8 個、少なくとも 2 0 個、少なくとも 3 0 個、又はそれ以上のアミノ酸を含み得る。

30

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されているような核酸構築物は、配列番号 6 ~ 1 1 の核酸配列に対して、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、又は 1 0 0 % の配列同一性を有する核酸配列を含む。

【 0 0 8 3 】

いくつかの実施形態において、R A B V - G のコード配列は、所望の特性が得られるように、例えば、安定性、効力、及び発現（例えば、翻訳効率）が増加され、その結果、バイオ治療薬の生成、送達、及び投与の影響を最大化できるような、再設計及び／又は最適化がなされる。例えば、いくつかの実施形態において、コード配列は、参照コード配列の発現レベルよりも高いレベルで発現されるように最適化されている。ヌクレオチド配列の配列最適化に関して、遺伝暗号の縮重は、遺伝子のタンパク質コード配列の少なくとも 1 つの塩基を、当該遺伝子から生成されるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させることなく、異なる塩基と置換する可能性を生み出す。故に、本開示の核酸構築物は、本明細書で開示されるあらゆるポリヌクレオチド配列から、遺伝暗号の縮重に従った置換によって変化した、いかなる塩基配列も、有する場合がある。コドン使用頻度を説明している参考文

40

50

献は、公的に容易に入手可能である。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチド配列のバリエーションが、様々な理由で、例えば、特定の宿主用に発現を最適化するために、生成されることがある（例えば、アルファウイルスmRNAにおけるコドン使用頻度を、ヒト、非ヒト霊長類、ハムスター、マウス、又はサルなどの他の生物に好まれるものに変えるなど）。したがって、いくつかの実施形態において、コード配列は、発現用に最適化されたコドンの使用を通じて、標的宿主細胞における発現用に最低化される。宿主細胞発現に最適な好ましいコドンを用いた遺伝子をコードする合成核酸配列を構築する手法は、宿主細胞ゲノムの未変性タンパク質をコードするコドン使用の共通性と、それらの相対的存在量を、当該技術分野において周知の手法で解析する計算法によって決定され得る。哺乳類細胞環境でのコドン最適化配列を作製するために、コドン使用頻度データベース（<http://www.kazusa.or.jp/codon>）が使用されてもよい。さらに、ある生物由来の配列を異なる宿主生物に最適なコドン使用頻度に変換するために、JCat社製コドン最適化ツール（www.jcat.de）、インテグレートッド・DNA・テクノロジーズ社（IDT）コドン最適化ツール（<https://www.idtdna.com/CodonOpt>）、又は、オプティマイザーオンラインコドン最適化ツール（<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER>）などの、種々のソフトウェアツールが利用できる。このような合成順序は、合成核酸分子を構築するための当該技術分野において公知の手法によって構築されてよく、また、様々な商用ベンダーから入手されてよい。

10

20

30

40

50

【0084】

いくつかの実施形態において、コード配列は、RNAの安定性及び／又は発現が増強されるように最適化される。RNAの安定性は、通常、RNAの「半減期」に関連する。「半減期」は、分子の活性、量、又は数の半分を除去するために必要とされる期間に関連する。本開示の文脈においては、RNAの半減期は、当該RNAの安定性を表すものである。RNAの半減期は、当該RNAの「発現の持続時間」に影響する場合がある。RNA安定性の増強で使用するための原理、戦略、及び方法に関するさらなる情報は、例えば、Lepek K. et al., Combinatorial optimization of mRNA structure, stability, and translation for RNA-based therapeutics. bioRxiv. (Preprint). Mar 30, 2021. doi: 10.1101/2021.03.29.437587で見出すことができる。

【0085】

組換え細胞

本開示の核酸構築物を宿主細胞に導入することで、上記核酸分子を含有する組換え細胞を作製することができる。したがって、本明細書に記載されているような改変されたアルファウイルスのゲノムをコードする核酸構築物を含有する原核細胞又は真核細胞も、本開示の特徴である。関連の態様において、本明細書で開示されるいくつかの実施形態は、動物細胞などの宿主細胞に、本明細書で提供されるような核酸構築物を導入し、次いで、形質転換細胞をセレクション又はスクリーニングすることを含む、細胞を形質転換する方法に関する。本開示の核酸構築物の細胞への導入は、例えば、ウイルス感染、トランスフェクション、接合伝達、原形質融合、リポフェクション、エレクトロポレーション、ヌクレオフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリエチレンジイミン（PEI）を介したトランスフェクション、DEAE-デキストランを介したトランスフェクション、リポソームを介したトランスフェクション、パーティクルガン技術、ダイレクトマイクロインジェクション、ナノ粒子を介した核酸送達などの、当業者に公知の方法によって、達成することができる。

【0086】

1つの態様では、本開示のいくつかの実施形態は、本明細書に記載の核酸構築物を含む、組換え細胞、例えば組換え動物細胞に関する。この核酸構築物は、宿主ゲノム内に安定に組み込まれていることがあり、あるいは、エピソームとして複製している、又は、安定

発現若しくは一過性発現を行うためのミニサークル発現ベクターとして組換え宿主細胞内に存在することがある。したがって、本開示のいくつかの実施形態では、核酸構築物は、エピソームユニットとして、組換え宿主細胞内で維持及び複製される。いくつかの実施形態では、核酸構築物は、組換え細胞のゲノムに安定に組み込まれる。安定な組み込みは、古典的なランダムな遺伝的組換え法を用いて、又は、ガイドRNA誘導型CRISPR/Cas9若しくはTALENゲノム編集を使用するなどの、より正確なゲノム編集法によって、達成することができる。いくつかの実施形態では、核酸構築物は、安定発現又は一過性発現を行うためのミニサークル発現ベクターとして組換え宿主細胞内に存在する。

【0087】

いくつかの実施形態において、組換え細胞は、大腸菌などの原核細胞、又は、昆虫細胞（例えば、蚊細胞若しくはSf21細胞）、若しくは哺乳類細胞（例えば、COS細胞、NIH 3T3細胞、若しくはHeLa細胞）などの真核細胞である。いくつかの実施形態において、上記細胞はインビボの細胞である。いくつかの実施形態において、上記細胞はエキソビボの細胞である。いくつかの実施形態において、上記細胞はインビトロの細胞である。いくつかの実施形態において、上記組換え細胞は真核細胞である。いくつかの実施形態において、上記組換え細胞は動物細胞である。いくつかの実施形態では、上記動物細胞は脊椎動物細胞又は無脊椎動物細胞である。いくつかの実施形態では、上記組換え細胞は哺乳類細胞である。好適な組換え細胞としては、SV40で形質転換したサル腎臓CV1細胞（COS-7）、ヒト胎児由来腎臓細胞（例えば、HEK293又はHEK293細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）、マウスセルトリ細胞（例えば、TM4細胞）、サル腎臓細胞（CV1）、ヒト子宮頸癌細胞（HeLa）、イヌ腎臓細胞（MDCK）、バッファローラット肝臓細胞（BRL3A）、ヒト肺細胞（W138）、ヒト肝臓細胞（Hep G2）、マウス乳腺腫瘍（MMT060562）、TRI細胞、FS4細胞、チャニーズハムスター卵巢細胞（CHO細胞）、アフリカミドリザル腎臓細胞（ベロ細胞）、ヒトA549細胞、ヒト子宮頸部細胞、ヒトCHME5細胞、ヒトPER.C6細胞、NS0マウス骨髄腫細胞、ヒト喉頭類表皮細胞、ヒト線維芽細胞、ヒトHUH-7細胞、ヒトMRC-5細胞、ヒト筋細胞、ヒト内皮細胞、ヒトアストロサイト細胞、ヒトマクロファージ細胞、ヒトRAW264.7細胞、マウス3T3細胞、マウスL929細胞、マウス結合組織細胞、マウス筋細胞、及びウサギ腎臓細胞が挙げられる。

【0088】

いくつかの実施形態において、上記組換え細胞は、昆虫細胞、例えば昆虫細胞株の細胞である。いくつかの実施形態において、上記組換え細胞はSf21細胞である。さらなる好適な昆虫細胞株としては、昆虫の双翅目、鱗翅目、及び半翅目から樹立された細胞株が挙げられるが、これらに限定はされず、様々な組織供給源から得ることができる。いくつかの実施形態では、上記組換え細胞は、鱗翅目昆虫細胞株の細胞である。過去数十年間で、鱗翅目昆虫細胞株の利用可能性は約50株/10年の速度で増加してきた。利用可能な鱗翅目昆虫細胞株に関するさらなる情報は、例えば、参照によって本明細書に援用される、Lynn D. E., Available lepidopteran insect cell lines. Methods Mol Biol. 2007; 388: 117-38に見出すことができる。いくつかの実施形態では、上記組換え細胞は、蚊細胞、例えば、ハマダラカ属（Anopheles）（An.）、イエカ属（Culex）（Cx.）、及びヤブカ属（Aedes）（ヒトスジシマカ）（Ae.）に含まれる蚊種の細胞である。本明細書に記載の組成物及び方法に好適な例示的な蚊細胞株としては、以下の蚊種から得られた細胞株が挙げられる：ネッタイシマカ（Aedes aegypti）、ヒトスジシマカ（Aedes albopictus）、アエデス・シュードスキュテラリス（Aedes pseudoscutellaris）、アエデス・トリセリアタス（Aedes triseriatus）、アエデス・ベクスアン（Aedes vexans）、ガンビアハマダラカ（Anopheles gambiae）、ステフェンスハマダラカ（Anopheles stephensi）、アノフェレス・アルビマヌス（Anopheles albimanus）、クレクス・クインクエファスキア

ツス (*Culex quinquefasciatus*)、クレクス・タイレリ (*Culex theileri*)、コガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*)、カラツイエカ (*Culex bitaeniorhynchus*)、及びトキシリンキテス・アンボイネンシス (*Toxorhynchites amboinensis*)。好適な蚊細胞株としては、CCL-125、Aag-2、RML-12、C6/26、C6/36、C7-10、AP-61、A.t. GRIP-1、A.t. GRIP-2、UM-AVE1、Mos. 55、Sua1B、4a-3B、Mos. 43、MSQ43、及び LSB-AA695BB が挙げられるが、これらに限定はされない。いくつかの実施形態では、上記蚊細胞は、C6/26 細胞株の細胞である。

【0089】

10

別の態様において、少なくとも1つの本明細書で開示されるような組換え細胞と、培地と、を含む細胞培養物が、本明細書で提供される。通常、上記培地は、本明細書に記載の細胞を培養するのに適したいかなる培地であってもよい。種々様々な上述の宿主細胞及び種を形質転換する手法が、当該技術分野において公知であり、技術文献及び科学文献に記載されている。したがって、本明細書で開示されるような組換え細胞を少なくとも1つ含む細胞培養物も、本願の範囲内である。細胞培養物を作製及び維持するのに適した方法及び系は当該技術分野において公知である。

【0090】

本明細書で開示される方法によって生成された組換えポリペプチドも、本開示の範囲内である。

20

【0091】

組換えポリペプチドを生成するための本開示の方法の非限定的且つ好ましい実施形態は、以下の特徴のうちの1又は複数を含む可能性がある。いくつかの実施形態では、本開示の組換えポリペプチドを生成するための方法は、生成されたポリペプチドを単離及び／又は精製することをさらに含む。いくつかの実施形態では、本開示のポリペプチドを生成するための方法は、半減期を延長するために、生成されたポリペプチドを構造的に改変することをさらに含む。

【0092】

医薬組成物

本開示の核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチドは、医薬組成物を含む組成物中に組み込まれることがある。このような組成物は、通常、本明細書に記載及び提供された核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチドのうちの1又は複数と、薬剤的に許容できる賦形剤、例えば担体と、を含む。いくつかの実施形態において、本開示の組成物は、狂犬病感染症の予防用、治療用、又は管理用に製剤化される。例えば、本開示の組成物は、薬剤的に許容できる賦形剤又はその混合物を含む、予防用組成物、治療用組成物、又は医薬組成物として製剤化されることがある。いくつかの実施形態では、本開示の組成物は、ワクチンとしての用途のために製剤化される。いくつかの実施形態では、本出願の組成物は、アジュバントとしての用途のために製剤化される。

30

【0093】

したがって、1つの態様において、薬剤的に許容できる賦形剤と、a) 本開示の核酸構築物；b) 本開示の組換え細胞；及び／又はc) 本開示の組換えポリペプチドと、を含む医薬組成物が、本明細書で提供される。

40

【0094】

本開示の医薬組成物の非限定的且つ好ましい実施形態は、以下の特徴のうちの1又は複数を含む可能性がある。本開示の核酸構築物は、ネイキッド形態で使用されることがあり、あるいは、送達媒体と製剤化されることがある。例示的な経路、遊離形態で使用する、例えば、核酸、例えばベクターに挿入される。例えば、以下でより詳細に説明されるように、本明細書に記載されているような核酸構築物は、ワクチンとして使用されることがある。

【0095】

50

本開示の医薬組成物に使用するために、本明細書に記載されているような核酸、又は組換え細胞は、送達媒体内に、又は送達媒体と、製剤化されることがある。本開示の組成物及び方法に好適な例示的な送達媒体は、リポソーム（例えば、中性リポソーム又はアニオン性リポソーム）、ミクロスフェア、免疫刺激複合体（ISCOMS）、脂質ナノ粒子（LNP）、ポリマーナノ粒子、ウイルスレプリコン粒子（VRP）を包含するが、これらに限定はされず、あるいは、送達を促進することができ、及び／又は免疫応答を増強することができる生物活性リガンドとコンジュゲートされる。これらの化合物は、当業者が容易に利用可能であり；例えば、*Liposomes: A Practical Approach*, RCP New Ed, IRL press（1990）を参照されたい。リポソームなど以外のアジュバントも使用され、当該技術分野において公知である。アジュバントは、抗原（例えば、srRNA構築物）を、局所的な沈殿物中に隔離することで、急速な分散から保護する場合があり、あるいは、マクロファージ走化性因子などの免疫系成分を分泌するように宿主を刺激する物質を含有する場合がある。例えば下記のものからの適切な選択は、当業者であれば行うことができる。

10

【0096】

したがって、いくつかの実施形態において、本開示の組成物は、以下のうちの1又は複数を含むことがある：生理的緩衝液、リポソーム、脂質ナノ粒子（LNP）、ポリマーナノ粒子、ウイルスレプリコン粒子（VRP）、ミクロスフェア、免疫刺激複合体（ISCOM）、生物活性リガンドのコンジュゲート、又はそれらの何れかの組み合わせ。

20

【0097】

いくつかの実施形態において、本開示の核酸構築物は、脂質ナノ粒子（LNP）によって細胞又は対象に送達されることがある。LNPは、通常、ウイルス粒子よりも免疫原性が低い。多くのヒトがウイルス粒子に対しては既存の免疫を持つが、LNPに対しては既存の免疫がない。加えて、LNPに対する適応免疫応答は起こりにくく、このことがLNPの反復投与を可能にする。

【0098】

本明細書に記載の組成物及び方法に好適な脂質は、カチオン性脂質、イオン化可能カチオン性脂質、アニオン性脂質、又は中性脂質とすることができる。

【0099】

いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、1又は複数のイオン化可能脂質を含むことがある。本明細書で使用される場合、「イオン化可能脂質」という用語は、pHが脂質のイオン性基のpKaよりも低くなると、カチオン性となる、又はイオン性になる（プロトン化する）が、pH値が高くなるほどに中性になっていく脂質を指す。pKaを下回るpH値では、この脂質は、負に帯電している核酸（例えば、オリゴヌクレオチド）と結び付くことが可能となる。本明細書で使用される場合、「イオン化可能脂質」という用語は、生理的pHからpHが下がると正電荷を呈する脂質、及び生理的pHなどの選択的pHで正味の正電荷を帯びるいくつかの脂質種のうちの何れかを包含する。DOTMAなどの永続的にカチオン性である脂質は、臨床用途には毒性が強すぎるということが分かっている。イオン化可能脂質は、他の実施形態における脂質製剤中に存在していることがあり、好ましくは、いくつかの実施形態では約30～約70mol%の範囲内で、他の実施形態では約30mol%で、他の実施形態では約40mol%で、他の実施形態では約45mol%で、他の実施形態では約47.5mol%で、さらに他の実施形態では約50mol%で、さらに他の実施形態では約60mol%で、存在している（「mol%」は、特定の成分の総モルに対する割合を意味する）。本段落における「約」という用語は、±5mol%の範囲を示す。DODMA、すなわち1,2-ジオレイルオキシ-3-ジメチルアミノプロパンはイオン化可能脂質であり、DLin-MC3-DMA又はO-(Z,Z,Z,Z-ヘプタトリアコンター-6,9,26,29-テトラエン-19-イル)-4-(N,N-ジメチルアミノ)（「MC3」）も同様である。

30

40

【0100】

本開示の組成物及び方法に好適である例示的なイオン化可能脂質としては、国際公開第

50

2020252589号パンフレット及び同第2021000041号パンフレット、米国特許第8,450,298号明細書及び同第10,844,028号明細書、並びにLove K. T. et al., Proc Natl Acad Sci USA, Feb. 2, 2010 107 (5) 1864-1869に記載されているものが挙げられ、これらは全て全体が参照によって本明細書に援用される。したがって、いくつかの実施形態において、本開示のLNPは、C16-96、C14-110、及びC12-200などの、上記のLove K. T. et al. 2010に記載されている1又は複数の脂質化合物を含む。いくつかの実施形態において、LNPはイオン化可能なカチオン性脂質を含む。好適なイオン化可能なカチオン性脂質は、ALC-0315、C12-200、LN16、MC3、MD1、SM-102、及びそれらのうちの何れかの組み合わせからなる群を含む。いくつかの実施形態において、本開示のLNPはC12-200を含む。C12-200脂質の構造は、当該技術分野において公知であり、例えば、その全体が参照によって本明細書に援用される、米国特許第8,450,298号明細書及び同第10,844,028号明細書に記載されている。いくつかの実施形態において、このC12-200は、コレステロール、C14-PEG2000、及びDOPEと組み合わせられる。いくつかの実施形態では、このC12-200は、DSPC、及びDMG-PEG2000と組み合わせられる。

10

【0101】

いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、1又は複数のカチオン性脂質を含む。好適なカチオン性脂質としては、98N12-5、C12-200、C14-PEG2000、DLin-KC2-DMA (KC2)、DLin-MC3-DMA (MC3)、XTC、MD1、及び7C1が挙げられるが、これらに限定はされない。いくつかの実施形態において、本開示のLNPは1又は複数の中性脂質を含む。本開示の組成物及び方法に好適である非限定的な中性脂質としては、DPSC、DPPC、POPC、DOPE、及びSMが挙げられる。いくつかの実施形態では、本開示のLNPは、全体が参照によって本明細書に援用される、国際公開第2020252589号パンフレット及び同第2021000041号パンフレットに記載されている、1又は複数のイオン化可能脂質化合物を含む。

20

【0102】

当該技術分野において公知である、他のいくつかの脂質又は脂質の組み合わせが、LNPを生成するために使用できる。LNPを生成するための使用に好適な脂質の非限定例としては、DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-コレステロール、DOTAP-コレステロール、GAP-DMORIE-DPYPE、及びGL67A-DOPE-DMPE-ポリエチレングリコール (PEG) が挙げられる。カチオン性脂質の非限定例としては、98N12-5、C12-200、C14-PEG2000、DLin-KC2-DMA (KC2)、DLin-MC3-DMA (MC3)、XTC、MD1、7C1、及びそれらの何れかの組み合わせが挙げられる。中性脂質の非限定例としては、DPSC、DPPC、POPC、DOPE、及びSMが挙げられる。PEG修飾脂質の非限定例としては、PEG-DMG、PEG-CerC14、及びPEG-CerC20が挙げられる。

30

40

【0103】

いくつかの実施形態において、本開示のLNPは少なくとも1種の脂質を含む。好適な脂質としては、C12-200、C14-PEG2000、DOPE、DMG-PEG2000、DSPC、DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-コレステロール、DOTAP-コレステロール、GAP-DMORIE-DPYPE、及びGL67A-DOPE-DMPE-ポリエチレングリコール (PEG) が挙げられる。いくつかの実施形態において、このC12-200は、コレステロール、C14-PEG2000、及びDOPEと組み合わせられる。いくつかの実施形態では、このC12-200は、DSPC、及びDMG-PEG2000と組み合わせられる。

【0104】

50

いくつかの実施形態において、LNP送達系中の核酸に対する脂質の質量比は、約100:1~約3:1、約70:1~10:1、又は16:1~4:1である。いくつかの実施形態において、LNP送達系中の核酸に対する脂質の質量比は、約16:1~4:1である。いくつかの実施形態において、LNP送達系中の核酸に対する脂質の質量比は、約20:1である。いくつかの実施形態において、LNP送達系中の核酸に対する脂質の質量比は、約8:1である。いくつかの実施形態において、脂質ナノ粒子は、約1000nm未満、約500nm未満、約250nm未満、約200nm未満、約150nm未満、約100nm未満、約75nm未満、約50nm未満、又は約25nm未満の平均直径を有する。いくつかの実施形態において、LNPは、約70nm~100nmの範囲の平均直径を有する。いくつかの実施形態において、LNPは、約88nm~約92nm、82nm~約86nm、又は約80nm~約95nmの範囲の平均直径を有する。

10

【0105】

いくつかの実施形態において、本開示の組成物は、リポソーム製剤とされる。いくつかの実施形態において、本開示の組成物は、脂質ナノ粒子(LNP)製剤とされる。いくつかの実施形態において、本開示の組成物は、ポリマーナノ粒子製剤とされる。

【0106】

上記のように、「構造脂質」又は「ヘルパー脂質」としても知られている中性脂質(neutral lipid)も、いくつかの実施形態では、脂質製剤及び脂質粒子に組み込まれることがある。脂質製剤及び脂質粒子は、1又は複数の構造脂質を組成物の約10~40mol%で含むことがある。好適な構造脂質は製造時の粒子の形成をサポートする。構造脂質は、生理的pHで陰イオン形態、非荷電形態、又は中性双性イオン形態の何れかで存在する、いくつかの脂質種のうちの何れか1つを指す。代表的な構造脂質としては、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、ジアシルホスファチジルグリセロール、セラミド、スフィンゴミエリン、ジヒドロスフィンゴミエリン、セファリン、及びセレブロシドが挙げられる。

20

【0107】

例示的な構造脂質としては、双性イオン性脂質、例えば、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン(POPC)、パルミトイルオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(POPE)、及びジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート(DOPE-mal)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)、ジミリストイルホスホエタノールアミン(DMPE)、ジステアロイル-ホスファチジルエタノールアミン(DSPE)、16-O-モノメチルPE(16-O-monomethyl PE)、16-O-ジメチルPE(16-O-dimethyl PE)、18-1-トランスPE(18-1-trans PE)、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジルエタノールアミン(1-stearoyl-2-oleoyl-phosphatidylethanolamine)(SOPE)、及び1,2-ジェライドイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン(1,2-dielaidoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)(トランスDOPE)が挙げられる。

30

40

【0108】

別の実施形態において、構造脂質は、生理的pHで負電荷を有するいかなる脂質とすることもできる。これらの脂質としては、ホスファチジルグリセロール、例えば、ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール(palmitoyl-oleoyl-phosphatidylglycerol)(POPG)、カルジオリピン、ホスファチジイノシトール、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、及び中性脂質に結合した他の陰イオン性修飾基が挙げられる。他の好適な

50

構造脂質としては、糖脂質（例えば、モノシアログングリオシド G M 1）が挙げられる。

【0109】

混合物の完全性を確保するために、脂質製剤の実施形態には安定化剤が含まれることがある。安定化剤は、分子間の疎水性－親水性相互作用を破壊する、又はその形成を助ける分子クラスである。好適な安定化剤としては、ポリソルベート 80（Tween 80、LUPAC 名オクタデカ－9－エン酸 2－[2－[3，4－ビス（2－ヒドロキシエトキシ）オキソラン－2－イル]－2－（2－ヒドロキシエトキシ）エトキシ]エチルとしても知られている）、Myrj 52（ポリオキシエチレン（40）ステアレート）、及び Brj（商標）S10（ポリオキシエチレン（10）ステアリルエーテル）が挙げられるが、これらに限定はされない。ポリエチレングリコールが結合した脂質も使用されてよい。これらの安定化剤は、単独で使用してもよいし、あるいは、互いに組み合わせて使用してもよい。

10

【0110】

いくつかの実施形態において、安定化剤は脂質混合物全体の約 1～3 Mol% を構成する。いくつかの実施形態において、安定化剤は脂質混合物全体の約 0.5～2.5 Mol% を構成する。いくつかの実施形態において、安定化剤は 2.5 Mol% より多く存在する。いくつかの実施形態において、安定化剤は 5 Mol% 存在する。いくつかの実施形態において、安定化剤は 10 Mol% 存在する。いくつかの実施形態において、安定化剤は、約 0.5、約 0.6、約 0.7、約 0.8、約 0.9、約 1.0、約 1.1、約 1.2、約 1.3、約 1.4、約 1.5、約 1.6、約 1.7、約 1.8、約 1.9、約 2.0、約 2.1、約 2.2、約 2.3、約 2.4、約 2.5 などである。他の実施形態において、安定化剤は脂質混合物の 2.6～10 Mol% である。他の実施形態において、安定化剤は脂質混合物の 10 Mol% より多く存在する。

20

【0111】

ある特定の用途のためにステロイドが脂質組成物に含まれることもあり、それから作製される脂質粒子としては、コレステロール及びフィトステロールなどのステロールが挙げられる。

【0112】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の治療用組成物、例えば、核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、狂犬病感染症を有する、それを有する疑いがある、対象を予防又は治療する方法で使用するための治療用組成物に、組み込まれる。狂犬病感染症を有することが疑われる対象は、アライグマ、スカンク、キツネ、コヨーテ、コウモリ、イヌ、ネコなどの、狂犬病感染症を有する、又は狂犬病感染症を有することが疑われる動物に噛まれたものであり得る。

30

【0113】

いくつかの実施形態において、上記組成物は、免疫原性組成物であり、例えば、対象における免疫応答を刺激することができる組成物である。いくつかの実施形態において、免疫原性組成物はワクチンとして製剤化される。いくつかの実施形態において、医薬組成物はアジュバントとして製剤化される。いくつかの実施形態において、免疫原性組成物は、バイオ治療薬として、例えば、生理活性を有する異なる分子の遺伝子送達のための運搬体として製剤化される。バイオ治療薬の非限定例としては、サイトカイン、ケモカイン、及び他の可溶性免疫調節剤、酵素、ペプチドアゴニスト及びタンパク質アゴニスト、ペプチドアンタゴニスト及びタンパク質アンタゴニスト、ホルモン、受容体、抗体及び抗体誘導体、増殖因子、転写因子、並びに遺伝子サイレンシング／編集分子が挙げられる。いくつかの実施形態において、医薬組成物はアジュバントとして製剤化される。

40

【0114】

いくつかの実施形態において、免疫原性組成物は、実質的に非免疫原性であるか、最低限の免疫原性を有する（例えば、対象における免疫応答を最低限にしか刺激しない組成物）。いくつかの実施形態において、非免疫原性又は最低限に免疫原性の組成物は、バイオ治療薬として製剤化される。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、鼻腔内投与用、

50

経皮投与用、腹腔内投与用、筋内投与用、リンパ節内投与用、腫瘍内投与用、関節内投与用、静脈内投与用、皮下投与用、腔内投与用、及び経口投与用のうちの1又は複数のために製剤化される。

【0115】

注射剤用途に好適な医薬組成物としては、無菌注射液又は無菌分散液を即時調製するための、無菌水性溶液又は無菌水性分散液、及び無菌散剤が挙げられる。静脈内投与の場合、好適な担体には、生理食塩水、静菌水、クレモフォールEL（商標）（BASF社、パーシッパニー、ニュージャージー州）、又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が含まれる。これらの場合において、上記組成物は、無菌であるべきであり、且つ、容易な通針性（*syringability*）を呈する程度に流動性であるべきである。上記組成物は、製造及び保管の条件下で安定とすることができ、細菌及び真菌などの微生物の混入行為から保護することができる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど）、及びこれらの適切な混合物、を含有する溶媒又は分散媒とすることができる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合に必要な粒径の維持によって、及び、界面活性剤、例えばドデシル硫酸ナトリウムの使用によって、維持することができる。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど、によって達成することができる。多くの場合で、上記組成物中には、通常、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトール、スクロース、トレハロースなどの多価アルコール、及び／又は塩化ナトリウムが含まれることとなる。いくつかの実施形態において、上記組成物は、トリス及びスクロースを含む。注射用組成物の持続的吸収は、吸収を遅延する薬剤、例えばステアリン酸アルミニウム及びゼラチン、を組成物に含めることによって達成することができる。

10

20

【0116】

無菌注射液は、必要量の活性化化合物を、適切な溶媒中に、必要に応じて上記成分の1種又は組み合わせと一緒に、混合した後、濾過滅菌を行うことで、調製できる。通常、分散液は、活性化化合物を、基礎となる分散媒及び上記に挙げたものの中から必要な他の成分を含有する無菌媒体中に混合することによって、調製される。

【0117】

いくつかの実施形態において、上記組成物は、鼻腔内投与用、経皮投与用、筋内投与用、リンパ節内投与用、静脈内投与用、腹腔内投与用、経口投与用、又は頭蓋内投与用のうちの1又は複数のために製剤化される。

30

【0118】

本開示の方法

本明細書に記載の治療用組成物、例えば、核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物の何れか1つの投与は、狂犬病ウイルス感染症などの関連する健康状態の治療で使用することができる。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されているような核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、免疫応答の誘導を必要とする対象において免疫応答を誘導するのに有用であり得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されているような核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、狂犬病感染症を有する、狂犬病感染症を有する疑いがある、又は狂犬病感染症を発症するリスクが高い可能性がある、対象を治療する方法で使用するための治療薬に、組み込まれ得る。いくつかの実施形態において、上記対象は、医師の治療を受けている患者である。

40

【0119】

したがって、1つの態様において、免疫応答の誘導を必要とする対象における免疫応答を誘導するための方法であって、a) 本開示の核酸構築物；b) 本開示の組換え細胞；c) 本開示の組換えポリペプチド；及び／又はd) 本開示の医薬組成物、を含む組成物を、上記対象に投与することを含む方法が、本明細書で提供される。

50

【0120】

いくつかの実施形態において、免疫応答はT細胞応答を含む。T細胞応答はインターフェロン γ （IFN γ ）の産生を含む場合がある。IFN γ の産生は、ELISpotアッセイを含むがこれらに限定はされない、当該技術分野において公知のいくつかの方法を用いて測定され得る。

【0121】

いくつかの実施形態において、免疫応答は中和抗体応答である。中和抗体応答は、免疫系の特殊化された細胞が、抗原の提示を認識し、特異的な免疫応答を発生させて、病原体、例えばウイルス（例えば、狂犬病ウイルス）からの標的細胞の感染を防ぐ免疫応答である。中和抗体応答を検出する方法は当該技術分野において公知であり、例えば、本明細書の実施例に記載されているようなアッセイを含む場合がある。例えば、中和抗体応答は、本明細書で開示される核酸構築物を1回投与した14日後にRFFIT法によって測定されることがある。中和抗体応答は、動物、例えばマウス又は非ヒト霊長類に本明細書に記載のsrRNA構築物を注射し、その動物から得られた血清の、ウイルスの細胞感染能を中和する能力を試験することで、示されることもある。いくつかの実施形態において、中和抗体応答は0.5IU/mL以上の中和抗体価を含む。

【0122】

別の態様において、狂犬病感染症の予防及び／又は治療を必要とする対象における狂犬病感染症を予防及び／又は治療するための方法であって、a)本開示の核酸構築物；b)本開示の組換え細胞；c)本開示の組換えポリペプチド；及び／又はd)本開示の何れか1つの医薬組成物を含む組成物を上記対象に予防目的又は治療目的で投与すること、を含む方法が、本明細書で提供される。

【0123】

いくつかの実施形態において、本開示の組成物は、その意図される投与経路と適合するように製剤化される。例えば、本開示の核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、経口的に、又は吸入によって、又は非経口経路を介して、与えられる場合がある。非経口投与経路の例としては、例えば、筋肉内投与、眼内投与、静脈内投与、リンパ節内投与、皮内投与、皮下投与、経皮（局所）投与、経粘膜的投与、腔内投与、及び直腸内投与が挙げられる。いくつかの実施形態において、上記組成物は筋肉内投与される。非経口適用に使用される溶液又は懸濁液は以下の成分を含むことができる：注射用蒸留水、食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒などの無菌の希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸（EDTA）などのキレート化剤；酢酸塩、クエン酸塩、又はリン酸塩、トリス、ショ糖などの緩衝剤、並びに塩化ナトリウム又はブドウ糖などの張度調整剤。pHは、リン酸一ナトリウム及び／若しくはリン酸二ナトリウム、塩酸、又は水酸化ナトリウムなどの酸又は塩基で調整（例えば、約pH7.2～7.8、例えば、pH7.5に）することができる。非経口用調製物は、ガラス製又はプラスチック製の、アンプル、使い捨て注射器、又は反復投与用バイアル内に封入することができる。

【0124】

本明細書に記載の治療用組成物、例えば、核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、1回又は複数回／日～1回又は複数回／週投与されることがあり；1日おきに1回を含む。本開示の主題の核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物の治療有効量による対象の治療は、1回の治療を含むことがあり、あるいは、一連の治療を含むことがある。いくつかの実施形態において、上記組成物は週ごとに投与され、例えば、1～2回、2～3回、又は3～4回の投与が、1～2週間、2～3週間、又は3～4週間の間隔で行われる。その後、追加の投与が1か月ごと、2か月ごと、3か月ごと、又は4か月ごとに行われる場合がある。いくつかの実施形態では、3～8週間の間隔で3回の筋肉内投与が行なわれた後、3か月ごと、6か月ごと、9か月ごと、又は12か月ごとに筋内投与が行なわれる。その後、追加の投与が1年ごと

、2年ごと、3年ごと、又は4年ごとに行われる場合がある。核酸構築物及び組換えポリペプチドに関しては、本開示の核酸構築物又は組換えポリペプチドの治療有効量（例えば、有効薬量）は、選択された核酸構築物又は組換えポリペプチドに依存する。

【0125】

上述したように、治療有効量は、健康状態、例えば狂犬病感染症を有する対象、それを有する疑いがある対象、又はそのリスクがある対象などの、対象に投与された場合に特定の効果を促進するのに十分な、治療用組成物の量を含む。いくつかの実施形態において、有効量は、疾患の症状の発症を予防若しくは遅延するため、疾患の症状の経過を変えるため（例えば、限定はされないが、疾患の症状の進行を遅くするため）、又は、疾患の症状を回復に向かわせるために十分な量を含む。

10

【0126】

疾患の徴候又は症状の少なくとも何れか1つ又は全てが改善又は寛解されたならば、治療は有効な治療と見なされる。効力は、入院又は医療行為の必要によって評価されるような、個体が悪化しないこと（例えば、疾患の進行が止まるか、少なくとも遅くなること）によっても、測ることができる。これらの指標を測定する方法は、当業者に公知であり、及び／又は本明細書に記載されている。治療は、対象又は動物（いくつかの非限定例はヒト、又は哺乳動物を含む）における疾患のあらゆる治療を含み、（1）上記疾患を阻害すること、例えば、症状の進行を止めること、若しくは遅くすること；又は、（2）上記疾患を軽減すること、例えば、症状の後退を引き起こすこと；及び、（3）症状の発症を抑制すること、若しくは症状の発症の可能性を低減すること、を含む。

20

【0127】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の組成物、例えば、核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物の、狂犬病感染症の治療において機能する能力は、ヒトでの使用前に適切な動物モデル系で試験されることがある。そのような動物モデル系としては、マウス、ラット、ハムスター、サルなどが挙げられるが、これらに限定はされない。これは、暴露後予防ワクチン接種によって狂犬病ウイルス感染症による疾患及び死亡を防御する能力によって測ることができる。

【0128】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されているような狂犬病ウイルス株が、本明細書に記載の組成物、例えば、核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物を後に投与される動物に暴露するために使用される。例示的な狂犬病ウイルス株としては、Flury LEP株、Flury LEP-C株、Flury HEP株、1088株、AT6株、CQ92株、CVS-11株、CVS-26株、CVS-26（G-N204S）株、CYN1009D株、CYN1026D株、CYN1029D株、CYN1138D株、CYN1140D株、CYN1141D株、CYN1242H株、CYN1243D株、CYN1244D株、CYN1245D株、CYN1247D株、CYN1249D株、CYN1250D株、CYN1251D株、CYN1252D株、CYN1253D株、CYN1255D株、CYN1256D株、CYN1257D株、CYN1259D株、CYN1260D株、CYN1261D株、GX4株、H-08-1320株、H-1413-09株、IP1586/10株、IP2990/13株、IP2991/13株、IP2992/13株、IP3176/09株、IP4005/12株、IP412/10株、IP542/10株、IP7941/09株、J株、JX-08-47株、JX08-48株、Kyoto株、Kyoto（G-S204N）株、N.HL株、RC.HL株、rHEP5.0-CVSG株、RRV ON-99-2株、SAD-B19株、SH06株、SHRBV-18株、SNK-CTN株、SRV9株、Street Alabama Dufferin（HCP-SAD）株、VRC-RZ2株、ZJ-LA株、及びZJ-QZ株が挙げられるが、これらに限定はされない。いくつかの実施形態において、使用される狂犬病ウイルスは、攻撃用ウイルス標準（Challenge Virus Standard）（CVS）-11である。

30

40

【0129】

50

例として、動物を狂犬病ウイルス株に感染させ、感染後 0 日目、1 日目、2 日目、3 日目、4 日目、5 日目、6 日目、7 日目、8 日目、9 日目、10 日目、11 日目、12 日目、13 日目、及び／又は 14 日目に、本明細書に記載の組成物、例えば、核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物を投与する。いくつかの実施形態において、上記組成物は LNP 製剤の状態である。いくつかの実施形態では、ヒト狂犬病免疫グロブリン (HRIG) 又は同様の狂犬病中和免疫グロブリン (例えば、ウマ狂犬病免疫グロブリン、ERIG) の添加が、srRNA 治療と組み合わせられる場合がある。いくつかの実施形態では、推奨用量 (20 IU/kg 体重の HRIG 又は 40 IU/kg 体重の ERIG) が投与される。動物は、およそ 35 ウイルス摂取後日数 (DPI) まで、又は未治療群 制御喪失まで、疾患の徴候がないかを毎日モニターされる。狂犬病ウイルス感染症はリアルタイムの逆転写酵素によるポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR) によってモニターされる場合がある。あるいは、直接蛍光抗体 (DFA) 検査法を用いて、標準方法に従って固定組織における狂犬病ウイルス染色を判定する場合がある。

10

【0130】

いくつかの実施形態において、本開示の核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、薬剂的に許容できる担体を含む組成物中で、且つ、免疫応答を刺激するのに有効な量で、対象に投与されることがある。通常、対象は、最初の一連の注射 (又は、下記の他の経路のうちの 1 つを介した投与) を通じて免疫化され、その後、最初の一連の投与によって得られた保護を増大するためのブースターが与えられ得る。この最初の一連の注射とその後のブースターは、対象における免疫応答を刺激するのに必要な投与量と期間で投与される。本開示の方法のいくつかの実施形態において、対象は哺乳動物である。いくつかの実施形態において、哺乳動物はヒト対象である。上記のように、注射剤用途に好適な薬剂的に許容できる担体には、無菌水溶液 (水溶性の場合) 又は無菌分散液、及び無菌注射液又は無菌分散液を即時調製するための無菌散剤が含まれる。これらの場合では、上記組成物は、無菌でなければならず、且つ、容易な通針性を呈する程度に流動性でなければならない。組成物はさらに、製造及び保管の条件下で安定でなければならず、細菌及び真菌などの微生物の混入行為から保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール (例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコールなど)、その適切な混合物、及び植物油を含有する溶媒又は分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材の使用によって、分散液の場合に必要な粒径の維持によって、及び、界面活性剤の使用によって、維持され得る。微生物の作用の防止は、様々な抗細菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなど、によって、達成することができる。

20

30

【0131】

無菌注射液は、必要量の核酸構築物、組換え細胞、及び／又は組換えポリペプチドを、適切な溶媒中に、必要に応じて上記成分の 1 種又は組み合わせと一緒に、混合した後、濾過滅菌を行うことで、調製することができる。

【0132】

核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物は、適切に保護されている場合、上記のように、例えば不活性な希釈剤又は同化可能な食用担体と共に、経口投与されてよい。核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物、並びに他の成分はまた、ハードシェルゼラチンカプセル又はソフトシェルゼラチンカプセル内に封入、錠剤に圧縮、又は個体の食事に直接混合されてよい。治療目的の経口投与の場合、活性化化合物は、賦形剤と混合されて、経口摂取可能な錠剤、バッカル錠剤、トローチ剤、カプセル剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ剤、カシェ剤などの形態で使用されてよい。

40

【0133】

さらなる治療法

いくつかの実施形態において、本開示の組成物は、単一の予防法又は治療法 (単独療法

50

）として個々に、又は、第 1 の治療法として少なくとも 1 つの追加の治療法（例えば、第 2 の治療法）と組み合わせて、対象に投与される。いくつかの実施形態において、第 2 の治療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、毒素療法、標的療法、及び外科手術からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、第 2 の治療法は、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法、毒素療法、又は外科手術からなる群から選択される。いくつかの実施形態において、第 1 の治療法及び第 2 の治療法は、同時に施行される。いくつかの実施形態において、第 1 の治療法は、上記第 2 の治療法と同時に施行される。いくつかの実施形態において、第 1 の治療法及び第 2 の治療法は、順次に施行される。いくつかの実施形態において、第 1 の治療法は、第 2 の治療法の前に施行される。いくつかの実施形態において、第 1 の治療法は、第 2 の治療法の後に施行される。いくつかの実施形態において、第 1 の治療法は、第 2 の治療法の前及び／又は後に施行される。いくつかの実施形態において、第 1 の治療法及び第 2 の治療法は、順番に施行される。いくつかの実施形態において、第 1 の治療法及び第 2 の治療法は、単一製剤と一緒に施行される。

10

【0134】

キット

また、本明細書に記載の方法を実践するための様々なキット、並びに、それを作製及び使用するための書面での説明書も、本明細書で提供される。特に、本開示のいくつかの実施形態は、対象における免疫応答を誘導するためのキットを提供する。いくつかの他の実施形態は、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法のためのキットに関する。例えば、いくつかの実施形態において、本明細書で提供及び記載されたような核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物のうちの 1 又は複数、並びにそれを作製及び使用するための書面での説明書を含むキットが、本明細書で提供される。

20

【0135】

いくつかの実施形態において、本開示のキットは、提供された核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物のうちの何れか 1 つを対象に投与するのに有用な、1 又は複数の手段をさらに含む。例えば、いくつかの実施形態において、本開示のキットは、提供された核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物のうちの何れか 1 つを対象に投与するために使用される、1 又は複数のシリンジ（プレフィルドシリンジを含む）及び／又はカテーテル（プレフィルドシリンジを含む）をさらに含む。いくつかの実施形態において、キットは、所望の目的のための、例えば、状態の診断、予防、又は治療を必要とする対象における状態を診断、予防、又は治療するための、他のキット成分と同時又は順次に投与され得る 1 又は複数の追加の治療薬を有することがある。

30

【0136】

前述のキットの何れかが、1 又は複数の追加の試薬をさらに含むことがあり、そのような追加の試薬は以下から選択され得る：希釈用緩衝液、再調製用溶液、洗浄用緩衝液、コントロール試薬、コントロール発現ベクター、ネガティブコントロール、ポジティブコントロール、提供された本開示の核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物のインビトロ生成に好適な試薬。

40

【0137】

いくつかの実施形態において、キットの成分は、別々の容器内にあることがある。いくつかの他の実施形態において、キットの成分は、単一の容器内で組み合わされていることがある。したがって、本開示のいくつかの実施形態において、キットは、本明細書に提供及び記載されているような核酸構築物、組換え細胞、組換えポリペプチド、及び／又は医薬組成物のうちの 1 又は複数、ある容器内（例えば、無菌のガラス製又はプラスチック製のバイアル内）に含み、さらなる治療薬を別の容器内（例えば、無菌のガラス製又はプラスチック製のバイアル内）に含む。

【0138】

50

別の実施形態において、キットは、所望により医薬組成物中で、単一の共通容器内で、一緒に製剤化された、1又は複数のさらなる治療薬と組み合わせられた、1又は複数の本開示の核酸構築物、組換え細胞、及び／又は組換えポリペプチドを含む、本明細書に記載の組成物の組み合わせを含む。

【0139】

キットが対象に非経口投与するための医薬組成物を含む場合、キットは、そのような投与を実行するためのデバイス（例えば、注射デバイス又はカテーテル）を含むことがある。例えば、キットは、本開示の核酸構築物、組換え細胞、及び／又は組換えポリペプチドを1又は複数含有する、1又は複数の皮下用注射針又は前述のような他の注射デバイスを含むことがある。

10

【0140】

いくつかの実施形態において、キットは、キットの構成要素を用いて本明細書で開示される方法を実施するための説明書をさらに含むことがある。例えば、キットは、キット内の医薬組成物及び剤形に関する情報を含む添付文書を含むことがある。通常、そのような情報は、患者及び医師が、同封された医薬組成物及び剤形を効果的且つ安全に使用する際の助けとなる。例えば、本開示の組み合わせに関する以下の情報が、挿入文書に補足される場合がある：薬物動態学、薬力学、臨床研究、有効性パラメーター、効能及び用法、禁忌、警告、注意事項、有害反応、過量、適切な用法・用量、剤形、適切な貯蔵条件、引用文献、製造業者／販売業者情報、並びに知的財産情報。

【0141】

上記方法を実施するための指示は、通常、好適な記録媒体上に記録される。例えば、指示は、紙又はプラスチックなどの基材上に印刷されることがある。指示は、キット内に添付文書としてや、キット又はその構成要素（例えば、包装又は副包装に関連する）の容器のラベル中などに存在することがある。指示は、適切なコンピューター可読記憶媒体上、例えばCD-ROM、ディスクット、フラッシュドライブ上などに存在する、電子記憶データファイルとして存在することがある。場合によっては、実際の指示がキット内に存在せず、遠隔の供給源から（例えば、インターネットを介して）指示を入手するための手段が提供されることがある。この実施形態の一例は、指示を閲覧することができる、及び／又は、指示をダウンロードすることができる、ウェブアドレスを含むキットである。指示と同様、この、指示を入手するための手段が、適切な基材上に記載されることがある。

20

30

【0142】

本開示に記載された全ての刊行物及び特許出願は、あたかも個々の刊行物又は特許出願が参照により援用されると明確且つ個別に示されたかのように、参照により本明細書に援用される。

【0143】

本明細書で引用されたいかなる参考文献も、先行技術を構成するものであることを認めるものではない。参考文献の考察は、その著者が主張することを述べたものであり、出願人は、引用された文献の正確性及び妥当性に異議を唱える権利を有する。科学雑誌の記事、特許文献、教科書を含むいくつもの情報源が本明細書で参照されているが、この参照が、これらの文献の何れかが当該技術分野における共通一般知識の一部を形成していることを認めるものではないことは、明確に理解されるであろう。

40

【0144】

本明細書に与えられた一般的な方法の議論は、例示のみを目的とすることが意図されている。他の代替方法及び代替物は、本開示を検討すれば当業者には明らかであり、本出願の精神及び範囲内に含まれるものとする。

【0145】

さらなる実施形態が以下の実施例でさらに詳細に開示されるが、これらは例示として提供されており、本開示又は請求項の範囲を何ら限定する意図はない。

【実施例】

【0146】

50

本発明の実施では、特に記載がない限り、当業者に周知である、分子生物学、微生物学、細胞生物学、生化学、核酸化学、及び免疫学の従来技術が採用されるものとする。そのような技術は、Sambrook, J., & Russell, D. W. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory and Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (jointly referred to herein as "Sambrook"); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: Wiley (including supplements through 2014); Bollag, D. M. et al. (1996). *Protein Methods*. New York, NY: Wiley-Liss; Huang, L. et al. (2005). *Nonviral Vectors for Gene Therapy*. San Diego: Academic Press; Kaplitt, M. G. et al. (1995). *Viral Vectors: Gene Therapy and Neuroscience Applications*. San Diego, CA: Academic Press; Lefkovits, I. (1997). *The Immunology Methods Manual: The Comprehensive Sourcebook of Techniques*. San Diego, CA: Academic Press; Doyle, A. et al. (1998). *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. New York, NY: Wiley; Mullis, K. B., Ferre, F. & Gibbs, R. (1994). *PCR: The Polymerase Chain Reaction*. Boston: Birkhauser Publisher; Greenfield, E. A. (2014). *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.). New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Beaucage, S. L. et al. (2000). *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*. New York, NY: Wiley, (including supplements through 2014); and Makrides, S. C. (2003). *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells*. Amsterdam, NL: Elsevier Sciences B.V. (これらの開示は参照によって本明細書に援用される)などの文献の中で十分に説明がなされている。

10

20

30

40

【0147】

さらなる実施形態が以下の実施例でさらに詳細に開示されるが、これらは例示として提供されており、本開示又は請求項の範囲を何ら限定する意図はない。

【0148】

実施例 1

アルファウイルスベクターの構築

本実施例は、後に目的遺伝子（例えば、RABV-G）を発現するベクターの構築に使用された、基本アルファウイルスベクター（例えば、異種の目的遺伝子を含まない）を構築するために行われた実験を記載している。

【0149】

50

EEEV 基本ベクター

基本EEEVベクター（すなわち、異種の目的遺伝子を含まない）を以下の通りに構築した：基本EEEVベクターを、4つの約4 kbの部分（ツイスト・バイオサイエンス社）に分けて、参照配列（Genbank EF151502）から、いくつかの改変を加えて、新規合成した。サイレント変異であるG301A変異、A3550C変異、G4516A変異、G5725A変異、G7399A変異を挿入することで制限酵素切断部位を排除した。ユニークな制限酵素切断部位（SpeI、5'-A'CTAG, T-3'）を、ネイティブなEEEV構造遺伝子のコード配列の代わりに挿入した（ここで、5'のAは構造ポリタンパク質のATG開始コドンの位置と一致しており、3'のTは構造ポリタンパク質の終止コドンTAAの位置と一致している）。後のGibson Assembly（登録商標）の手順（Gibson et al., Nat. Methods 6, 343-345, 2009）のために、5'アダプター配列（5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAAACCCCTGGACCT-3'；配列番号2）をSpeI部位の上流に挿入し、3'アダプター配列（5'-GACCGCTACGCCCCCAATGACCCGACCAAGC-3'；配列番号3）をSpeI部位の下流に挿入した。バクテリオファージT7のRNAポリメラーゼプロモーター（5'-TAATACGACTCACTATAG-3'；配列番号4）を、EEEVゲノム配列の上流に含め、下流にはポリA配列と、それに続いて、認識部位の上流を切断するSapI部位とを含めた。SapI部位のすぐ下流はT7の転写終結配列（5'-AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTTT-3'；配列番号5）であり、これにユニークな制限酵素切断部位（NotI、5'-GC'GGCC, GC-3'）が続く。これらの部分を、5ピースGibson Assembly（登録商標）反応（直線化されたpYL骨格と4つの合成断片）で結合することで、EEEV基本ベクターを得た。

【0150】

CHIKV 基本ベクター

基本CHIKV S27ベクターを、4つの約4 kbの部分（ツイスト・バイオサイエンス社、サーモフィッシャー社GeneArt）に分けて、参照配列（Genbank AF369024）から、サイレントなA5366G変異を加え、さらに、CHIKV構造遺伝子のコード配列の代わりにユニークな制限酵素切断部位（SpeI、5'-A'CTAG, T-3'）を加えて、新規合成した（ここで、5'のAは構造ポリタンパク質のATG開始コドンの位置と一致しており、3'のTは構造ポリタンパク質の終止コドンTAAの位置と一致している）。後のGibson Assembly（登録商標）の手順のために、5'アダプター配列（5'-CTGGAGACGTGGAGGAGAAACCCCTGGACCT-3'；配列番号2）をSpeI部位の上流に挿入し、3'アダプター配列（5'-GACCGCTACGCCCCCAATGACCCGACCAAGC-3'；配列番号3）をSpeI部位の下流に挿入した。バクテリオファージT7のRNAポリメラーゼプロモーター（5'-TAATACGACTCACTATAG-3'；配列番号4）を、CHIKVゲノム配列の上流に含め、下流にはポリA配列と、それに続いて、認識部位の上流を切断するSapI部位とを含めた。SapI部位のすぐ下流はT7の転写終結配列（5'-AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTTT-3'；配列番号5）であり、これにユニークな制限酵素切断部位（NotI、5'-GC'GGCC, GC-3'）が続く。これらの部分を、5ピースGibson Assembly（登録商標）反応（直線化されたpYL骨格と4つの合成断片）で結合することで、CHIKV S27基本ベクターを得た。

【0151】

CHIKV DRDE基本ベクターを、参照配列（Genbank EF210157）から、S27の3'UTRをDRDEの3'UTRの代わりに使用したこと以外は同様に構築した。

【0152】

SINV 基本ベクター

基本S I N Vガードウッドベクターは、S I N V構造遺伝子のコード配列の代わりにユニークな制限酵素切断部位（S p e I、5' - A' C T A G, T - 3'）を有するガードウッド株参照配列（G e n b a n k M F 4 5 9 6 8 3）からの4つの約4 k b部分（ツイスト・バイオサイエンス社、サーモフィッシャー社G e n e A r t）として新規合成した（ここで、5' Aは、構造ポリタンパク質遺伝子のヌクレオチド93に続くP 2 A配列の次のヌクレオチドであり、3' Tは構造ポリタンパク質の終止コドンT G Aの場所と一致する）。バクテリオファージT 7のRNAポリメラーゼプロモーター（5' - T A A T A C G A C T C A C T A T A G - 3'；配列番号4）を、S I N Vゲノム配列の上流に含め、下流にはポリA配列と、それに続いて、認識部位の上流を切断するS a p I部位とを含めた。S a p I部位のすぐ下流はT 7の転写終結配列（5' - A A C C C C T C T C T A A A C G G A G G G G T T T T T T T T - 3'；配列番号5）であり、これにユニークな制限酵素切断部位（N o t I、5' - G C' G G C C, G C - 3'）が続く。これらの部分を、5ピースG i b s o n A s s e m b l y（登録商標）反応（例えば、直線化されたp Y L骨格と4つの合成断片）で結合することで、S I N V G i r d w o o d基本ベクターを得た。

10

【0153】

基本S I N V A R 8 6ベクターを、参照配列（G e n b a n k U 3 8 3 0 5）から、n s P 2コード配列がG i r d w o o d参照配列由来であること以外は同様に構築した。

【0154】

20

V E E基本ベクター

基本V E Eベクターを、4つの約4 k bの部分（ツイスト・バイオサイエンス社、サーモフィッシャー社G e n e A r t）に分けて、T C - 8 3株の参照配列（G e n b a n k L 0 1 4 4 3）から、サイレントなA 2 0 8 7 G変異を加え、さらに、V E E構造遺伝子のコード配列の代わりにユニークな制限酵素切断部位（S p e I、5' - A' C T A G, T - 3'）を加えて、新規合成した（ここで、5'のAは、構造ポリタンパク質遺伝子の第93番ヌクレオチドに続くP 2 A配列の次のヌクレオチドであり、3'のTは構造ポリタンパク質の終止コドンT G Aの位置と一致する）。後のG i b s o n A s s e m b l y（登録商標）の手順のために、5'アダプター配列（5' - C T G G A G A C G T G G A G G A G A A C C C T G G A C C T - 3'；配列番号2）をS p e I部位の上流に挿入し、3'アダプター配列（5' - G A C C G C T A C G C C C C A A T G A C C C G A C C A G C - 3'；配列番号3）をS p e I部位の下流に挿入した。バクテリオファージT 7のRNAポリメラーゼプロモーター（5' - T A A T A C G A C T C A C T A T A G - 3'；配列番号4）を、V E Eゲノム配列の上流に含め、下流にはポリA配列と、それに続いて、認識部位の上流を切断するS a p I部位とを含めた。S a p I部位のすぐ下流はT 7の転写終結配列（5' - A A C C C C T C T C T A A A C G G A G G G G T T T T T T T T - 3'；配列番号5）であり、これにユニークな制限酵素切断部位（N o t I、5' - G C' G G C C, G C - 3'）が続く。これらの部分を、5ピースG i b s o n A s s e m b l y（登録商標）反応（例えば、直線化されたp Y L骨格と4つの合成断片）で結合することで、V E E基本ベクターを得た。

30

40

【0155】

R A B V - G導入遺伝子を、5'及び3'の各アダプター配列に相同なフランキング領域（f l a n k）を有するように合成し（I D T社）、S p e Iで線状化された基本ベクターにG i b s o n A s s e m b l y（登録商標）で挿入することで、最終ベクターを得た。

【0156】

実施例2

改変されたアルファウイルスベクターのインビトロ評価

本実施例は、上記実施例1に記載の合成アルファウイルスs r R N A構築物のR N A複製及びR A B V - G発現レベルを評価するために、さらに、その挙動（例えば、R N A複

50

製及びタンパク質発現)の差異を調べるために実施された、インビトロ実験の結果を記載している。

【0157】

インビトロ転写：インビトロで、SapIで線状化されたプラスミド鋳型から、バクテリオファージT7ポリメラーゼを用いて、5'ARCAキャップ(HiScribe(商標)T7ARCA mRNA Kit、NEB社)含む、又は、キャッピングしない転写(HiScribe(商標)T7 High Yield RNA Synthesis Kit、NEB社)の後に5'キャップ1を付加(Vaccinia Capping System, mRNA Cap 2'-O-Methyltransferase、NEB社)することによる、転写によって、RNAを調製した。次に、フェノール／クロロホルム抽出、又はカラム精製(Monarch(登録商標)RNA Cleanup Kit、NEB社)を用いてRNAを精製した。260nmにおける吸光度によってRNA濃度を測定した(Nanodrop、サーモフィッシャー・サイエンティフィック社)。

10

【0158】

RNA複製：RNAを、BHK-21細胞又はベロ細胞に、エレクトロポレーションで導入した(例えば、4D-Nucleofector(商標)、ロンザ社)。形質転換の15～22時間後に、細胞を固定・透過処理(eBioscience(商標)Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set、インビトロジェン社)し、PE結合型抗dsRNAマウスモノクローナル抗体(J2、サイコン社)を使用して染色して、dsRNA+細胞の頻度及び個々の細胞におけるdsRNAの平均蛍光強度(MFI)を蛍光フローサイトメトリーで定量化した。結果を図1に示す。

20

【0159】

タンパク質発現：RNAを、BHK-21細胞又はベロ細胞に、エレクトロポレーションで導入した(例えば、4D-Nucleofector(商標)、ロンザ社)。形質転換の15～22時間後に、細胞を固定・透過処理(eBioscience(商標)Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set、インビトロジェン社)し、AF647結合型抗RABV-G抗体(1c5)を使用して染色した。AF647の平均蛍光強度(MFI)をRABV-G発現の読み取り値として用いた。結果を図2に示す。

30

【0160】

実施例3

インビボにおける改変アルファウイルスベクターの評価

本実施例は、本明細書に記載のsrRNA構築物を評価するために行われたインビボ実験の結果を記載している。

【0161】

これらの実験では、種々のアルファウイルス株に由来する合成srRNA構築物を設計し、その後評価した。

【0162】

マウス及び注射

BALB/cマウスはチャールズ・リバー・ラボラトリーズ社、エンヴィーゴ社、又はジャクソン・ラボラトリー社(Jackson Laboratories)から購入した。投与当日、0.15µg又は1.5µgの物質を、片方の四頭筋に、又は両方の四頭筋に分割して、筋肉内注射した。ベクターはLNP製剤化した。動物を、体重及び他の一般的な観察事項について、試験期間を通じてモニターした。免疫原性試験では、0日目のみ、又は0日目と21日目に動物に投与を行った。

40

【0163】

LNP製剤

srRNAを、マイクロ流体ミキサーを用いて脂質ナノ粒子製剤にして、粒径の分析、

50

動的光散乱を用いた多分散性の分析、及び封入効率の分析を行った。脂質はエタノールに分散させた。RNAは250mMのNaOAc (pH4.0)に82 μ g/mlの濃度となるように懸濁し、3:1 (水性:有機)の流速で混合した。

【0164】

ELISpot

RABV-G特異的なT細胞応答の規模を測定するため、Mouse IFN γ ELISpot PLUS Kit (HRP) (マブテック社)を使用して、製造業者の取扱説明書に従って、IFN γ ELISpot分析を行った。RABV-GをコードするsrRNAの筋肉内注射の14日後のレスポナー脾臓T細胞に対応するスポット形成単位として測定された、マウスIFN γ 検出用のELISpotアッセイの結果を、図3に示す。総T細胞応答(100万個の細胞当たりの計数されたスポット形成単位としてプロット)がY軸に示されている。

10

【0165】

RFFIT法による中和抗体応答:ワクチンによって生じた中和抗体価を測定するため、血清を筋内投与の14日目のマウスから採取し、マルチチャンバースライド内で標準量の狂犬病ウイルスと一緒に、希釈・混合・インキュベートした。短期間のインキュベーションの後、狂犬病ウイルスに感染・複製されやすい細胞をこの血清ウイルス混合物に加え、一晚(約16~24時間)インキュベートすることで、中和されなかったウイルスを細胞に感染させ、増殖させた。次に細胞を固定し、蛍光顕微鏡を用いて、狂犬病ウイルス産生について染色した。血清試料ごとに最大で合計20個の顕微鏡視野を読み取り、参照用コントロール血清-ウイルス混合物を含むスライドに対して比較を行った。血清希釈度ごとに感染細胞を計数し、中和抗体価(neutralization titer)を求めるのに使用した。最終的なRFFIT法の結果は、計数値に血清の希釈倍率を掛けた算出値である。RFFIT法の結果は、血清抗体価(serum titer)として表されることも、あるいは、血清1ミリリットル当たりの抗体の国際単位(IU)で表されることもあり、後者は、被験血清の中和活性を比較することで行われた既知のIU濃度を有する参照血清の中和活性と比較されている(図4)。

20

【0166】

実施例4

狂犬病感染症を治療するための狂犬病ウイルス暴露後予防としての改変されたアルファウイルスベクターのインビボ評価

30

本実施例は、本明細書に記載のsrRNA構築物を評価するために行われたインビボ実験を記載している。

【0167】

これらの実験では、様々なアルファウイルス株に由来する合成srRNA構築物が設計され、その後、暴露後予防ワクチン接種によって狂犬病ウイルス感染症による疾患及び死亡を防御する能力を評価されている。

【0168】

狂犬病ウイルス 攻撃

攻撃用ウイルス標準(CVS)-11はアメリカ合衆国培養細胞系統保存機関(ATCC)から購入し、ベビーハムスター腎臓(BHK)-21細胞において増殖させる。

40

【0169】

LNP製剤

srRNAを、マイクロ流体ミキサーを用いて脂質ナノ粒子製剤にして、粒径の分析、動的光散乱を用いた多分散性の分析、及び封入効率の分析を行う。脂質はエタノールに分散させる。RNAは250mMのNaOAc (pH4.0)に82 μ g/mlの濃度となるように懸濁し、3:1 (水性:有機)の流速で混合する。

【0170】

マウス及び注射

BALB/cマウスはチャールズ・リバー・ラボラトリーズ社、エンヴィーゴ社、又は

50

ジャクソン・ラボラトリー社 (J a c k s o n L a b o r a t o r i e s) から購入する。srRNA投与の前日(−1日目)、マウスに1回量が $10^{2.5}$ 50%細胞培養感染量のCVS-11を鼻腔内接種させる。srRNA投与日(0日目、又は0日目と14日目)、0.1μg、1μg、又は10μgの物質を、片方の四頭筋に、又は両方の四頭筋に分割して、筋肉内注射する。srRNAはLNP製剤化する。動物を、体重及び臨床観察事項について、試験期間を通じてモニターする。いくつかの群では、ヒト狂犬病免疫グロブリン(HRIG)又は同様の狂犬病中和免疫グロブリンの添加が、srRNA治療と組み合わせられる場合がある。

【0171】

疾患増悪

マウスは、およそ35ウイルス摂取後日数(DPI)まで、又は未治療群 制御喪失まで、疾患の徴候がないかを毎日モニターする。以下のように進行した、典型的な疾患パターンをスコア化する：群から孤立(スコア1)、動きが遅い／活発さが減少(スコア2)、肢不全麻痺(スコア3)、非協調運動(スコア4)、自発的な動きの欠如(スコア5)、刺激に対する反応がない(スコア6)、及びマウスが頭をケージの敷材に埋め、呼吸が遅くなることを特徴とする最終段階(スコア7)。疾患増悪はDPIの関数として毎日のスコアをプロットすることで表される。インキュベーション期間はウイルス摂取から疾患徴候の最初の出現までの期間と定義される。マウスはスコア6に達したら頸椎脱臼で安楽死させる。結果はカプラン-マイヤー生存曲線で表される。

【0172】

ウイルス量

脳における狂犬病ウイルス感染症を、リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)を用いて確認する。脳をホモジナイズし、製造業者の取扱説明書(RNeasyキット、キアゲン社)に従ってRNAを抽出する。あるいは、直接蛍光抗体(DFIA)検査法を用いて、標準方法に従って固定組織における狂犬病ウイルス染色を判定する場合がある。

【0173】

本開示の特定の代替案を開示してきたが、添付の特許請求の範囲の真の精神及び範囲内で、様々な変更及び組み合わせが可能であり、想定されることを理解されたい。したがって、本明細書で提示された要旨及び開示に厳密に限定する意図はない。

10

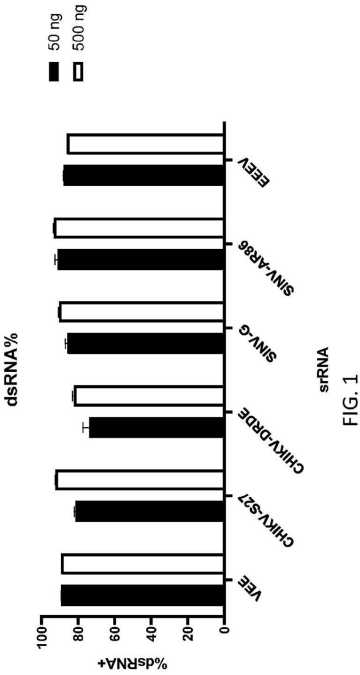
20

30

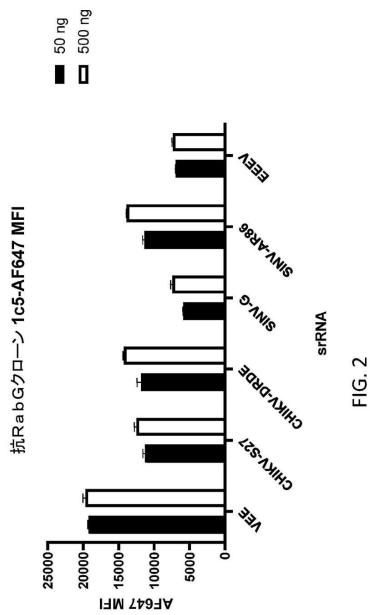
40

50

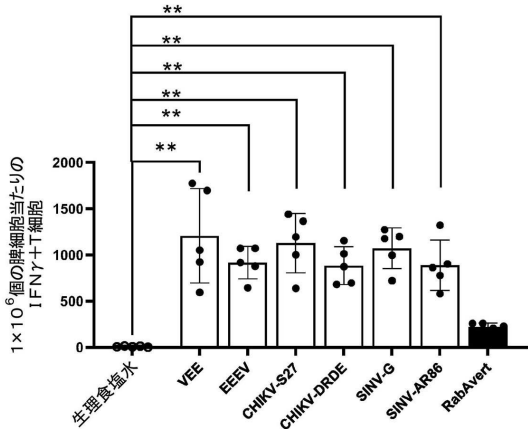
【図面】
【図 1】



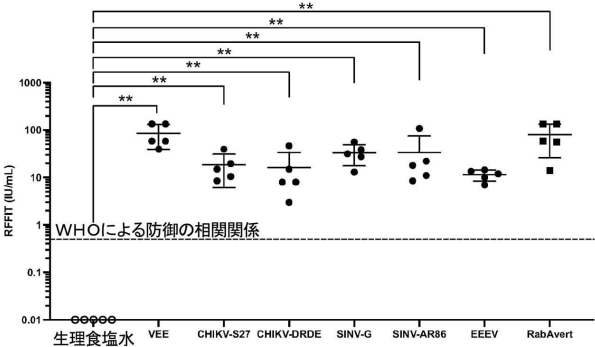
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

20

30

40

50

【配列表】

2025513827000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US23/65677

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - INV. C07K 14/145; A61K 39/205; A61P 31/14 (2023.01) ADD. CPC - INV. C07K 14/145; A61K 39/205; A61P 31/14 ADD. A61K 2039/5254; C12N 2760/20134; C12N 2770/36141 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YA-NAN ZHANG, ET AL. "A novel rabies vaccine based on infectious propagating particles derived from hybrid VEEV-Rabies replicon" 1-11. EBioMedicine 58 (2020) 102819. Web. 14 May 2020; abstract; page 2, 2nd column, 2nd and 4th paragraphs; page 5, 2nd column, 2nd paragraph	1-5
A	US 8,589,533 B1 (BROWN DENNIS T) 08 July 2003; Abstract; column 3, lines 61-64; column 6, lines 62-67	1-5
A	CHRISTOPHE PREHAUD, ET AL. "Attenuation of Rabies Virulence: Takeover by the Cytoplasmic Domain of Its Envelope Protein" 1-5. SCIENCE SIGNALING. Web. 19 January 2010; Page 1, first paragraph ('Tipping the Balance' section); DOI: 10.1126/scisignal.2000510	5
A	PATRICE COULON, ET AL. "An Avirulent Mutant of Rabies Virus Is Unable To Infect Motoneurons In Vivo and In Vitro" 273-278. JOURNAL OF VIROLOGY, Jan. 1998, Vol. 72, No. 1. Web. January 1998; Title	5
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 11 July 2023 (11.07.2023)		Date of mailing of the international search report AUG 21 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/65677

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US23/65677

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-29
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 K 39/205 (2006.01)	A 6 1 K 39/205	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 9/51 (2006.01)	A 6 1 K 9/51	
A 6 1 K 9/127(2025.01)	A 6 1 K 9/127	
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5

,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁理士 池田 達則

(72)発明者 ナサニエル スティーブン ワン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ソレント バレー ロード 1 1 5 5 8, スイート 6, シー／オー リプリケイト バイオサイエンス, インコーポレイティド

(72)発明者 シゲキ ジョーセフ ミヤケーストナー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ソレント バレー ロード 1 1 5 5 8, スイート 6, シー／オー リプリケイト バイオサイエンス, インコーポレイティド

(72)発明者 バリナズ アリアマド

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ソレント バレー ロード 1 1 5 5 8, スイート 6, シー／オー リプリケイト バイオサイエンス, インコーポレイティド

(72)発明者 アンドリュー ジェアール

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ソレント バレー ロード 1 1 5 5 8, スイート 6, シー／オー リプリケイト バイオサイエンス, インコーポレイティド

F ターム (参考) 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 CA45

4C076 AA16 AA19 AA65 BB15 CC06

4C084 AA13 MA21 MA24 MA38 MA66 NA14 ZB091 ZB092 ZB211 ZB212
ZB331 ZB332

4C085 AA03 AA38 BA64 CC03 CC05 DD62 EE01 EE06 GG03